



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**“Caracterización de la vía de señalización de $G_{\beta\gamma}$ -PI3K-AKT-mTOR en
la mutante CaSR_{N639K} presente en cáncer de mama”**

T E S I S

Que presenta

Biol. Jorge Eduardo del Rio Robles

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOLOGÍA CELULAR

Directora de tesis:

Dra. Guadalupe Reyes Cruz

Ciudad de México

Agosto, 2018

Este trabajo estuvo apoyado por la beca con número de registro 613967/780078 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y fue realizado en el Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Doctora Guadalupe Reyes Cruz y apoyado por el proyecto CONACyT 240119.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis fue posible gracias al trabajo conjunto de varias personas, que, con consejos, observaciones, enseñanzas y correcciones, hicieron posible el desarrollo del proyecto el cual me permitiré agradecer en este apartado.

Al Centro de Investigación y de Estudio Avanzados del Instituto Politécnico Nacional y al Departamento de Biología Celular por permitirme formar parte de este gran grupo profesional y permitir mi crecimiento académico.

A la Dra. Guadalupe Reyes Cruz, por haberme recibido en su grupo de investigación, adicionalmente agradezco su valiosa paciencia, dirección, seguimiento y dedicación continua que permitieron formarme y finalizar mi proyecto.

A mis asesores de tesis, los doctores José Vázquez Prado y Fernando Navarro García, por sus observaciones, sugerencias y paciencia durante la revisión de este proyecto.

Agradezco también el apoyo y dedicación de la auxiliar Biol. Margarita Raquel Valadez Sánchez y el Técnico Jaime Estrada Trejo del laboratorio 19 del departamento de Biología Celular.

También quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio Carlos Alejandro Egusquiza Alvarez, Lennis Beatriz Orduña Castillo, Misael Nery Dionisio Vicuña, Tania Yareli Gutiérrez López y César Zavala Barrera, por compartir sus consejos, amistad, conocimientos, observaciones y excelentes experiencias.

A mis compañeros del laboratorio 35 de Farmacología, por sus observaciones, consejos y amistad

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme y apoyarme una beca con número de registro 613967/780078 durante la maestría.

DEDICATORIA

A mis **Padres**, por permitirme realizar esta carrera, por el apoyo, consejos, regaños y palabras de aliento, porque a pesar de todo siempre están presentes, para seguir adelante en las buenas y en las malas, por darme siempre su confianza y creer en mí; sin ustedes no sería nada en la vida.

A mis **Hermanos**, por brindarme bonitos momentos, experiencias y consejos para salir adelante, porque a pesar de todo siempre estaremos juntos.

A la persona que ha sido uno de los apoyos más importantes para la finalización de este trabajo, por confiar en mí y hasta el último momento ha estado conmigo siempre, gracias por todo **Karen (MEME)**, nunca te defraudaré.

INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS	i
INDICE DE TABLAS	ii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT	v
INTRODUCCIÓN.....	1
1. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEINAS G	1
2. ESTRUCTURA DE LOS GPCRs	2
3. CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS G.....	3
4. ACTIVACIÓN Y SEÑALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS G HETEROTRIMÉRICAS POR GPCRs	4
5. GPCRs EN CÁNCER.....	6
6. EL RECEPTOR SENSOR DE CALCIO EXTRACELULAR	8
6.1. Estructura del CaSR	9
6.2. Señalización del CaSR	11
6.3. Papel Fisiológico del CaSR.....	13
6.4. Enfermedades relacionadas con el CaSR	14
6.5. El CaSR en cáncer	15
6.6. El CaSR en mama	16
6.7. El CaSR en cáncer de mama.....	17
JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS	22
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS PARTICULARES	22
METODOLOGÍA	23
Transfección estable de la mutante CaSR _{N639K} en células HEK-293.....	23
Expresión de hCaSR silvestre (CaSR _{Silvestre}) y la mutante CaSR _{N639K} en células HEK-293.....	24
Curso temporal de la activación de la vía de señalización Gβγ-PI3K-AKT-mTOR por el CaSR _{Silvestre} y el CaSR _{N639K}	26
Efecto de los Inhibidores (NPS-2143 y Calhex) del CaSR en la señalización sobre la activación de p-AKT y p-S6.....	27

Inhibición de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K-AKT-mTOR	29
Análisis de la secreción de factores quimiotácticos por estímulo de la mutante CaSR _{N639K} y CaSR _{Silvestre}	29
Obtención de medios condicionados de las células con el CaSR _{Silvestre} y el CaSR _{N639K}	30
Migración de células PAE en cámara de Boyden por estímulos con los medios condicionados	31
Determinación de la identidad de los factores quimiotácticos secretados en respuesta a la estimulación de la mutante CaSR _{Silvestre} y el CaSR _{N639K}	32
RESULTADOS	35
Curso temporal de la activación de la vía de señalización $G\beta\gamma$ -PI3K-AKT-mTOR por el CaSR _{Silvestre} y el CaSR _{N639K}	36
Efecto de los inhibidores del CaSR (NPS-2143 y Calhex) sobre la vía de señalización $G\beta\gamma$ -PI3K-AKT-mTOR	37
Inhibición de la vía de transducción de señales $G\beta\gamma$ -PI3K-AKT-mTOR en la mutante CaSR _{N639K}	40
Análisis de la secreción de los factores quimiotácticos promovidos por el CaSR _{Silvestre} y la mutante CaSR _{N639K} y su efecto en la migración de células endoteliales de aorta de porcino (PAE).....	41
Identificación de los factores quimiotácticos secretados por las clonas estables CaSR _{Silvestre} (Clona 7) y la clona CaSR _{N639K}	43
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	49
PRESPECTIVAS	49
REFERENCIAS	50

INDICE DE FIGURAS

N° de Figura	Título	Pagina
Figura 1.	Estructura de los GPCRs.	3
Figura 2.	Clasificación y señalización de las proteínas G heterotriméricas en GPCRs.	5
Figura 3.	GPCRs con mayor frecuencia de mutaciones en cáncer.	7
Figura 4.	La transactivación de EGFR inducida por GPCRs.	8
Figura 5.	Esquema representativo del CaSR dimérico.	11
Figura 6.	Representación generalizada de vías de señalización mediadas por CaSR.	12
Figura 7.	Papel Fisiológico del CaSR.	14
Figura 8.	El receptor sensor de calcio y los <i>hallmarks</i> del cancer.	16
Figura 9.	El círculo vicioso osteolítico en el cáncer de mama metastásico en el hueso.	18
Figura 10.	Mutaciones del CaSR presentes en Cáncer de mama.	20
Figura 11.	Dilución seriada del estándar de citocinas.	33
Figura 12.	Expresión del CaSR _{Silvestre} y del CaSR _{N639K} .	35
Figura 13.	Curvas de activación de los efectores de la vía de Gβγ-PI3K-AKT-mTOR estimulando al CaSR _{Silvestre} y el CaSR _{N639K}	37
Figura 14.	Efecto de los calcilíticos del CaSR en la fosforilación de AKT tanto para el CaSR _{Silvestre} como para el CaSR _{N639K} .	38
Figura 15.	Efecto de los calcilíticos del CaSR en la fosforilación de S6 tanto para el CaSR _{Silvestre} como para el CaSR _{N639K} .	39
Figura 16.	Efecto en la fosforilación de AKT y S6 por los inhibidores Wortmanina y Rapamicina.	40
Figura 17.	Curva dosis/tiempo de la secreción de factores quimiotácticos en la clona CaSR _{N639K} .	42
Figura 18.	Análisis de la secreción de factores quimiotácticos secretados en respuesta a la estimulación de la mutante CaSR _{N639K} y CaSR _{Silvestre} .	43
Figura 19.	Determinación de la identidad de los factores quimiotácticos secretados en respuesta a la estimulación del CaSR.	45

INDICE DE TABLAS

N° de Tabla	Título	Pagina
Tabla 1.	Diluciones empleadas de anticuerpos primarios para AKT y S6 y secundarios.	27
Tabla 2.	Condiciones experimentales para la inhibición del CaSR.	28
Tabla 3.	Condiciones de uso de inhibidores de la vía Gβγ-PI3K-AKT-mTOR.	29
Tabla 4.	Condiciones de estímulos para la curva dosis/tiempo	30
Tabla 5	Condiciones de estímulo para la obtención de medios condicionados y para la determinación de factores quimiotácticos	32

RESUMEN

El receptor sensor de calcio (CaSR) es un receptor acoplado a proteínas G (GPCR) que fisiológicamente regula la homeostasis del calcio y la secreción de hormonas, citocinas y factores de crecimiento. Este GPCR se acopla a tres grupos principales de proteínas G heterotriméricas: $G_{q/11}$, $G_{i/o}$ y $G_{12/13}$ y en casos como en el cáncer activa a G_s . Además, existe evidencia que el CaSR es capaz de activar la vía de PI3K-AKT-mTOR a través del heterodímero $\beta\gamma$. Se ha descrito que mutaciones en las asas intracelulares producen una alteración en el acoplamiento con las proteínas G heterotriméricas repercutiendo en la señalización, sin embargo, existen pocos reportes sobre la participación de la primera asa intracelular con el acople de las proteínas G y su efecto en la señalización. Resultados preliminares demuestran que la mutante CaSR_{N639K} encontrada en cáncer de mama posee un switch en el acoplamiento de las proteínas $G\alpha$. Por lo que, en este trabajo decidimos caracterizar el efecto de la mutación CaSR_{N639K}, ubicada en la primera asa intracelular en la vía de señalización de $G\beta\gamma$ -PI3K-AKT-mTOR, ya que alguna alteración de la vía podría repercutir en la secreción de factores quimiotácticos. Los resultados obtenidos muestran que la mutante CaSR_{N639K} tiene una capacidad disminuida, respecto al CaSR silvestre, para promover la señalización de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K-AKT-mTOR en respuesta a calcio extracelular y el calcimimético R-568. Además, esto se correlacionó con un menor efecto en la secreción de factores quimiotácticos, detectados en medios condicionados, específicamente, la interleucina 8 (IL-8) y la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (CCL2/MCP-1), que fueron identificadas mediante citometría de flujo. Nuestros resultados permiten sugerir que la mutante CaSR_{N639K} localizada en la primera asa intracelular produce un efecto inactivante en la vía de señalización $G\beta\gamma$ -PI3K-AKT-mTOR afectando en la secreción de factores quimiotácticos, lo que también sugiere que la primera asa intracelular podría estar participando en el acople con las proteínas G heterotriméricas.

ABSTRACT

The calcium-sensing receptor (CaSR) is a receptor coupled to G proteins (GPCR), physiologically regulates calcium homeostasis and the secretion of hormones, cytokines and growth factors. This GPCR binds to three major groups of heterotrimeric G proteins: Gq/11, Gi/o and G12/13 and in cases such as cancer active at Gs. In addition, there is evidence that CaSR is capable of activating the PI3K-AKT-mTOR pathway through the $\beta\gamma$ heterodimer. It has been described that mutations in intracellular cells produce an alteration in the coupling with heterotrimeric G proteins having an impact on signaling, however, there are few reports on the participation of the former as intracellular with the G protein vessel and its effect in signaling. Preliminary results that the mutant CaSR_{N639K} found in breast cancer has a switch in the coupling of G α proteins. Therefore, in this work we decided to characterize the effect of the CaSR_{N639K} mutation, in the first intracellular in the signaling pathway of G $\beta\gamma$ -PI3K-AKT-mTOR, since the alteration of the pathway could affect the secretion of the factors chemotactic. The results showed that the mutant CaSR_{N639K} has a decreased capacity, compared to wild CaSR, to promote the signaling of the G $\beta\gamma$ -PI3K-AKT-mTOR pathway in response to extracellular calcium and the calcimimetic R-568. In addition, this was correlated with a lower effect on the secretion of chemotactic factors, detected in conditioned media, specifically, interleukin 8 (IL-8) and monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2 / MCP-1), which were identified by flow cytometry. Our results suggest that the mutant CaSR_{N639K} located in the first as an intracellular product is an inactivating effect in the G $\beta\gamma$ -PI3K-AKT-mTOR signaling pathway that affects the secretion of chemotactic factors, which also suggests that the former is intracellular. participating in the context with heterotrimeric G proteins.

INTRODUCCIÓN

1. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEINAS G

La evolución de los organismos multicelulares ha sido altamente dependiente de la capacidad desarrollada por sus células para comunicarse entre sí y con su entorno. Las células responden a señales ambientales a través de la activación de receptores ubicados en la superficie de la membrana plasmática, dedicados a reconocer moléculas mensajeras intercelulares. De estos, la familia más grande es la de los receptores acoplados a proteína G (GPCR, por sus siglas en inglés *G protein-coupled receptor*). Esta familia contiene de 1000 a 2000 miembros, codificados en más de 800 genes dentro del genoma humano (Bockaert, Pin, 1999).

Los GPCRs se pueden activar mediante una amplia gama de ligandos extracelulares que incluyen aminas biogénicas, neuropéptidos, aminoácidos, iones, hormonas, quimiocinas, mediadores derivados de lípidos, péptidos de proteasas, proteínas, fotones, protones (H⁺) e iones como el Ca²⁺ extracelular. En base a la similitud de secuencia y estructural, esta familia de receptores se divide en 5 subfamilias principales, denominadas: A (Rhodopsina), B (Secretina) y C (Glutamato/Metabotrópica); aparte se encuentran los receptores Frizzled y de Adhesión (Katrictch et al., 2013). La subfamilia A es la más grande de este grupo de receptores y se subdivide en 4 grupos denominados α , β , γ y δ (Fredriksson et al., 2003). En esta subfamilia se incluyen a los receptores para la luz (rodopsina), los receptores adrenérgicos y para el olfato (Pierce et al., 2002). La subfamilia B comprende 25 miembros, comúnmente llamada familia de la secretina. Los miembros de esta subfamilia son el receptor de calcitonina (CALCR), la hormona liberadora de corticotropina (CRHR), glucagón (GCGR), polipeptídico inhibidor gástrico (GIPR), péptidos similares al glucagón (GLPR), la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRHR), de la hormona paratiroidea (PTHrP), de secretina (SCTR) y péptido vasoactivo intestinal (VIPR). Toda esta subfamilia parece acoplarse a la proteína Gs. La subfamilia C consiste en receptores metabotrópicos de glutamato (GRM), los receptores GABBA, el receptor sensor de calcio (CASR) y receptores que se cree que son receptores gustativos (TAS1) esta familia se caracteriza por una región amino grande que se pliega en dos lóbulos, formando una estructura denominada "*Venus Fly Trap*" (VFT, por sus siglas en inglés) donde se une el ligando, y hace que los lóbulos se cierren alrededor del ligando. Por otro lado, la subfamilia de los receptores Frizzled incluye a los receptores con el mismo nombre y los receptores TAS2. Los receptores Frizzled controlan el destino, la proliferación y la polaridad de la célula durante el desarrollo de los metazoos mediando señales de glicoproteínas secretadas denominadas Wnt. Con respecto a la familia de los receptores

de adhesión esta consta de receptores con regiones transmembrana de tipo GPCR fusionadas en la región amino con uno o varios dominios funcionales con motivos homólogos a los presentes en proteínas de adhesión, tales como repeticiones similares al EGF, regiones similares a la mucina y conservados motivos ricos en cisteína (Fredriksson et al., 2003).

2. ESTRUCTURA DE LOS GPCRs

Los GPCRs comparten una arquitectura común conformada por una región amino terminal del lado extracelular, siete segmentos hidrofóbicos transmembrana (7TM) α -helicoidal (hélices I-VII) conectados por tres asas extracelulares (ECL, por sus siglas en inglés, ECL1-3) y tres asas intracelulares (ICL, por sus siglas en inglés, ICL1-3) y la región carboxilo terminal intracelular. Las proteínas G citosólicas, las arrestinas, las cinasas de los receptores acoplados a las proteínas G (GRK) y otros efectores de señalización corriente abajo interactúan con las asas intracelulares y con el carboxilo terminal. (Fig. 1) (Kobilka, 2006). Los GPCRs comparten la mayor homología en los siete segmentos transmembrana. Las estructuras más variables son el carboxilo terminal y la tercera asa intracelular que conecta al TM5 y TM6. Por su parte, la región del amino terminal, es la más diversa en los GPCRs, esta secuencia es relativamente corta (10-50 aminoácidos) en los receptores de monoaminas y péptidos, y es más grande (350-600 aminoácidos) en los receptores de hormonas glicoproteicas y los receptores de la familia del glutamato. Las regiones amino terminales más grandes se observan en los receptores de la familia de adhesión. Como se puede apreciar, los GPCRs son diversos en secuencia y longitud; sin embargo, las estructuras resultantes muestran similitudes lo que indica mecanismos similares de transducción de señales (Zhang et al., 2015; Kobilka, 2006).

Para la mayoría de los GPCRs, la unión del ligando natural da como resultado un cambio en la conformación del receptor, lo que permite el acoplamiento de proteínas transductoras tales como proteínas G heterotriméricas o β -arrestinas. Esto es seguido por la activación de una cascada de proteínas de señalización intracelular, que finalmente da como resultado una respuesta fisiológica.

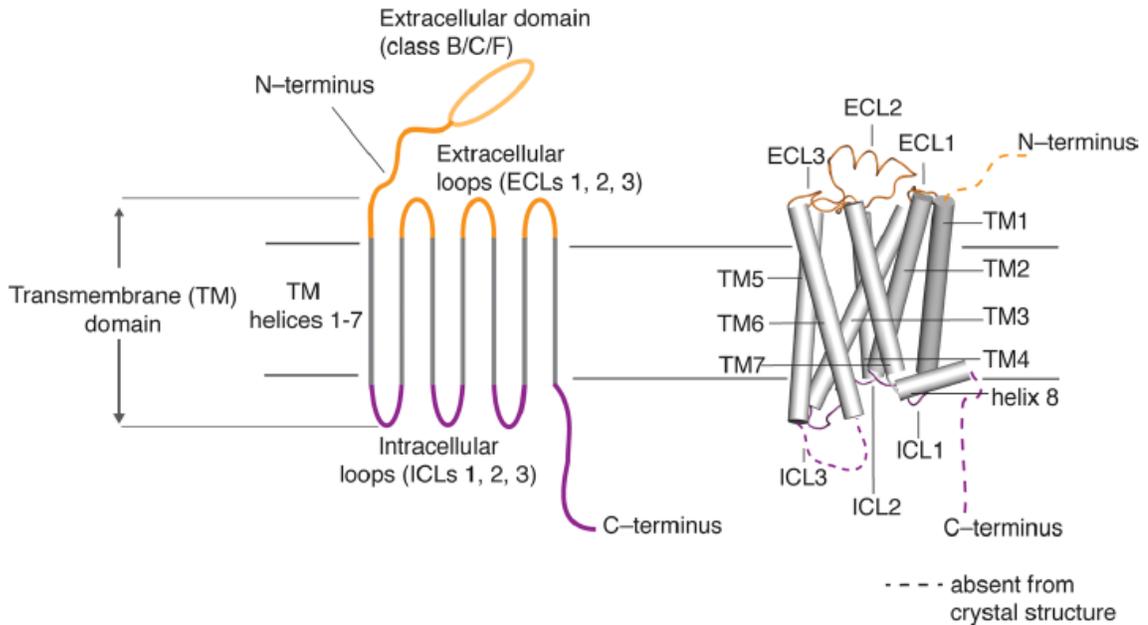


Figura 1. Estructura de los GPCRs. Los GPCRs poseen una estructura de 3 partes principales: La región amino terminal y las asas extracelulares (ECL1-3) que tienen la capacidad de reconocer y unir ligandos para algunos receptores; el núcleo estructural formado por siete segmentos transmembranales (TM1-7) que mediante cambios conformacionales producidos por la unión al ligando transmiten la señal a la parte intracelular, un carboxilo terminal y los 3 asas intracelulares (ICL1-3) que interactúan y activan a las G heterotriméricas y otras proteínas de señalización. (Imagen tomada de Latorraca et al., 2016).

3. CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS G

Las proteínas G heterotriméricas transmiten directamente las señales de los GPCRs y están compuestas por las subunidades α , β y γ . Las subunidades β y γ están estrechamente asociadas y pueden considerarse como una unidad funcional.

Las proteínas $G\alpha$ funcionan como interruptores moleculares por su actividad biológica determinada por el nucleótido de guanina unido y se agrupan en cuatro familias con base en la secuencia y las similitudes funcionales: $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha q}$ y $G_{\alpha 12}$. En la familia $G_{\alpha s}$ (s significa estimulación), existen dos miembros: $G_{\alpha s}$ y $G_{\alpha olf}$ (olf representa olfacción). Las $G_{\alpha s}$ se expresan en la mayoría de los tipos celulares y la $G_{\alpha olf}$ se expresa específicamente en neuronas sensoriales olfativas. La familia $G_{\alpha i}$ (i significa inhibición) es la familia más grande y diversa, se expresa en la mayoría de los tipos celulares y está compuesta por $G_{\alpha i1}$, $G_{\alpha i2}$, $G_{\alpha i3}$, $G_{\alpha o}$, $G_{\alpha t}$, $G_{\alpha q}$ y $G_{\alpha z}$. La familia $G_{\alpha q}$ consiste en $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha 11}$, $G_{\alpha 14}$ y $G_{\alpha 16}$ (el equivalente del ratón es $G_{\alpha 15}$). $G_{\alpha q}$ y $G_{\alpha 11}$ se expresan de manera ubicua, mientras

que la expresión de G α 14 y G α 15/16 es más restringida. En cuanto a la familia G α 12, existen 2 subgrupos G α 12 y la G α 13 que se expresan en la mayoría de los tejidos. Además de estas subunidades G α , las proteínas G heterotriméricas contienen subunidades G $\beta\gamma$. En el genoma humano existen 5 genes G β y 12 G γ . G β 1, G β 2, G β 3 y G β 4 comparten una alta similitud de secuencia (entre 80 y 90%), mientras que G β 5 es ~ 50% similar a otras subunidades G β . G β 5 se encuentra principalmente en el cerebro y las otras subunidades G β están ampliamente distribuidas. Las subunidades G γ son más diversas y comparten similitudes de secuencia que varían del 20% al 80%. (Syrovatkina et al., 2016).

4. ACTIVACIÓN Y SEÑALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS G HETEROTRIMÉRICAS POR GPCRs

En el pasado, el modelo de receptor de "dos estados" (inactivo y activo) fue ampliamente aceptado para explicar la función del GPCR; sin embargo, ahora se favorece un modelo "multiestado" más complejo que implica una alta dinámica conformacional del GPCR y debido a esto existe más de una conformación de un receptor. Por lo tanto, diferentes ligandos pueden inducir distintos estados conformacionales de los receptores después de la activación, iniciando varios perfiles específicos de señalización río abajo. Varios cambios conformacionales en un solo GPCR, provocados por diferentes agonistas promueven vías de señalización diferentes, a esto se denomina "agonismo sesgado" (Bar-Shavit et al., 2016).

La vía clásica de activación de la señalización del receptor acoplado a proteínas G (GPCR) contempla que un agonista se une a regiones extracelulares y/o transmembranales del receptor conduciendo a su interacción con proteínas G heterotriméricas. Por lo que, el GPCR actúa como un factor de intercambio de nucleótidos de guanina, catalizando el intercambio de GDP por GTP en la subunidad G α , induciendo a su vez a la disociación de las subunidades G α y G $\beta\gamma$ entre sí y del GPCR (Kobilka et al. 2018).

Las subunidades G α con GTP o activadas se unen posteriormente y regulan la actividad de efectores tales como adenilato ciclasa (AC), RhoGEF y fosfolipasa C β (PLC β). Estos a su vez modulan otros efectores río abajo ya sea directamente o mediante la generación de segundos mensajeros como AMP cíclico, diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trisfosfato (Ins (1,4,5) P3) que activan cinasas u otros efectores, como la proteína-kinasa A (PKA) y proteína-kinasa C (PKC). Las subunidades $\beta\gamma$ tras su liberación de la proteína G heterotrimérica, también pueden reclutar y regular ciertos efectores, tales

como GRKs, canales iónicos, fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K), y PLC β (Fig. 2). Por otro lado, las proteínas RGS (por sus siglas en ingles reguladores de la señalización de proteínas G) poseen la función de acelerar la actividad de GTPasa de las subunidades G α y la subsiguiente desactivación de las proteínas G. Por lo tanto, las RGS se consideran un regulador de la señalización de la proteína G (Ritter and Hall, 2009; Kobilka et al. 2018).

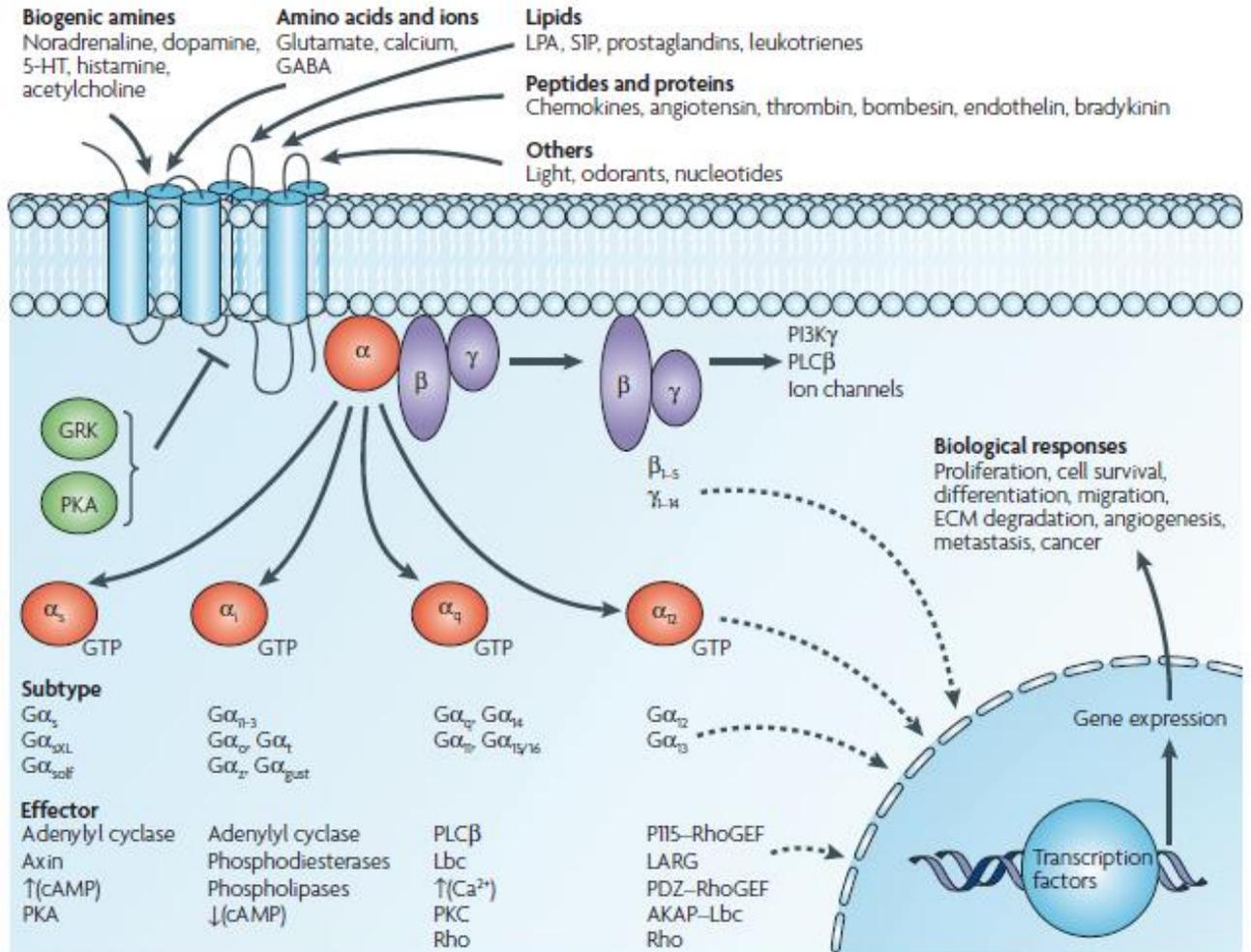


Figura 2. Clasificación y señalización de las proteínas G heterotriméricas en GPCRs. Para que la activación de los GPCRs ocurra se necesita el reconocimiento de un ligando para promover el intercambio de GDP (estado inactivo) por GTP (estado activo) en la subunidad G α y con ello la disociación del heterotrímero G α y G $\beta\gamma$. Como se puede apreciar en la figura, la señalización y la activación de los efectores dependerá de la subunidad G α a la que esta acoplada el GPCR (Dorsam and Gutkind, 2007).

5. GPCRs EN CÁNCER

El desarrollo de cáncer implica la presencia y acumulación de varias alteraciones genéticas en oncogenes y genes supresores de tumores, que desencadenan una serie de eventos celulares entre los que sobresalen, la resistencia a la apoptosis, el crecimiento celular descontrolado, la proliferación, la pérdida de la senescencia celular, la migración y secreción de factores quimiotácticos y de crecimiento, que promueven el microambiente tumoral y la metástasis. Datos recientes han indicado que muchos GPCRs y sus ligandos están involucrados en estos eventos o procesos celulares llevando a la malignidad. Por lo tanto, se considera que los GPCRs son uno de los objetivos terapéuticos más útiles para tratar el cáncer y que la señalización celular mediada por estos se ha convertido en una estrategia importante para la investigación de nuevos fármacos contra el cáncer.

Un número creciente de estudios vincula la expresión y activación aberrante de los GPCRs y el desarrollo de numerosos tipos de tumores malignos. Por ejemplo, varios GPCRs se sobreexpresan en diferentes tumores y las variantes pueden conducir a un mayor riesgo de cáncer. Además, una activación aberrante de GPCRs por altos niveles de ligando como LPA, S1P y quimiocinas está involucrada en la transformación celular, en la proliferación celular, la angiogénesis, la metástasis y la resistencia a los medicamentos (Liu et al. 2016; Lappano and Maggiolini, 2012).

Se ha demostrado claramente que tanto las mutaciones activantes como las inactivantes en los genes de los GPCRs causan enfermedades en humanos, incluida el cáncer. Hasta la fecha, los estudios clínicos combinados con estudios de expresión funcional in vitro han identificado más de 600 mutaciones inactivantes y casi 100 mutaciones activadoras en los GPCRs, los cuales están implicadas en más de 30 diferentes enfermedades en humanos. Las mutaciones en estos receptores pueden ser *missense* (un aminoácido sustituido por otro) y mutaciones sin sentido (codones de paro inapropiadamente localizados) (Liu et al. 2016).

Por otro lado, un estudio de secuenciación de muestras tumorales reveló alteraciones genómicas que pueden ser la base de la progresión tumoral y podría ser un apoyo para clasificar a los pacientes con cáncer en grupos de tratamiento específicos. Este estudio destacó el potencial oncogénico de los GPCRs y sus transductores de señal (O'Hayre et al. 2013).

A partir de un análisis sistemático de mutaciones somáticas en genomas de cáncer se encontró que los GPCRs están mutados en aproximadamente el 20% de todos los cánceres. Los GPCRs mutados con mayor frecuencia fueron el receptor estimulante de la hormona tiroidea (TSHR) y el receptor sensor de calcio (CaSR, por sus siglas en inglés, *Calcium Sensing Receptor*). Las mutaciones también

son evidentes en metástasis de tumores tales como melanomas o tumores de pulmón, próstata, intestino grueso y pancreático. (Fig. 3) (O'Hayre et al. 2013).

Gene	Protein identifier (amino acid length)	Total number of samples	Total number of unique samples	Number of protein-altering mutations	Number of synonymous mutations	Protein-altering mutations (%)
<i>GPCRs of interest</i>						
TSHR	P16473 (764)	5381	320	322	13	96.1%
CASR	P41180 (1078)	3615	53	59	22	72.8%
SMO	Q99835 (787)	6617	52	53	8	86.9%
FSHR	P23945 (695)	4047	51	53	19	73.6%
LHCGR	P22888 (699)	4111	44	46	9	83.6%
CCKBR	P32239 (447)	4097	44	44	15	74.6%
PROKR2	Q8NFJ6 (384)	3615	36	37	15	71.2%
NMUR2	Q9GZQ4 (415)	4046	32	32	12	72.7%
GPR149	Q86SP6 (731)	3615	29	30	16	65.2%
PTGFR	P43088 (359)	4049	25	25	6	80.6%
MAS1L	P35410 (378)	4047	18	19	8	70.4%
P2RY2	P41231 (377)	4024	19	19	6	76.0%
MAS1	P04201 (325)	4046	18	18	3	85.7%
P2RY8	Q86VZ1 (359)	4308	17	17	6	73.9%
BDKRB2	P30411 (391)	4254	14	15	7	68.2%
VIPR1	P32241 (457)	3614	7	8	5	61.5%

Figura 3. GPCRs con mayor frecuencia de mutaciones en cáncer. Tabla representativa de la cantidad de mutaciones en genes que codifican para GPCRs obtenida a partir de un análisis en la base de datos COSMIC (Catalogo de mutaciones somáticas en cáncer). Donde se presenta el porcentaje de mutaciones por cada receptor y el número de muestras analizadas para el estudio. Los receptores mutados con mayor frecuencia en cáncer son el receptor estimulante de la hormona tiroidea (TSHR) y el receptor sensor de calcio (CaSR) (Tomada y modificada de O'Hayre et al. 2013).

Otra de las causas por la cual los GPCRs se involucran en la progresión del cáncer es por su papel en la transactivación de receptores de factores de crecimiento, favoreciendo así la activación de moléculas de señalización río abajo relacionadas en el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la metástasis. Además, se ha reportado que la transactivación del EGFR por los GPCRs contribuye a la progresión de los tumores de colon, pulmón, mama, ovario, próstata, cabeza y cuello (Fig. 4). La estimulación por su agonista de diversos GPCRs como trombina, LPA, estrógeno, bombesina y endotelina, conduce a la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) mediante la liberación autocrina y paracrina de ligando similares a EGF unidos a la superficie celular y la generación posterior de la señalización intracelular que promueve la progresión del cáncer (Lappano and Maggiolini, 2011).

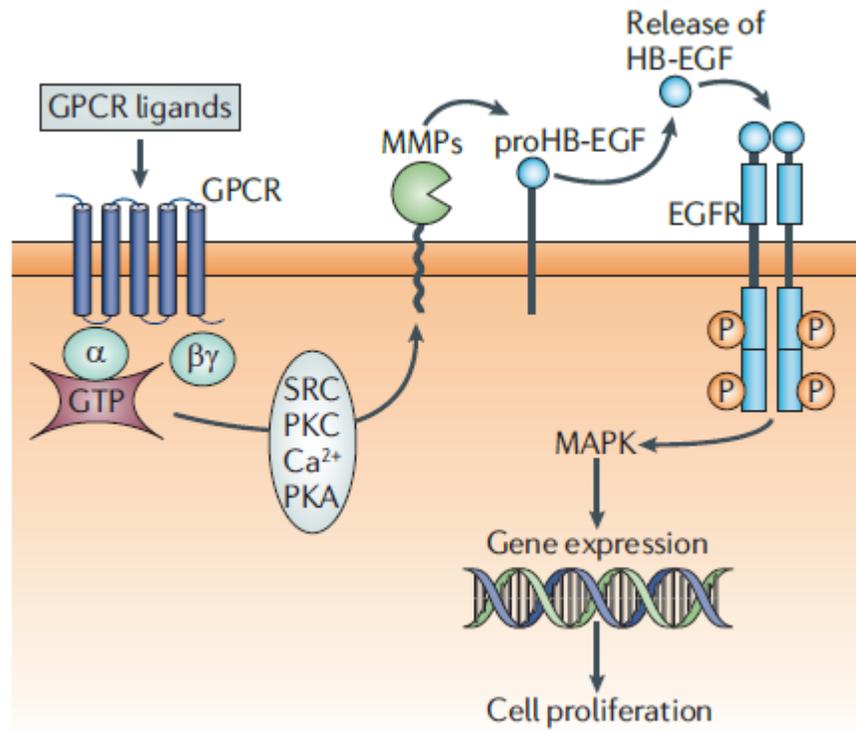


Figura 4. La transactivación de EGFR inducida por GPCRs. La activación de los receptores acoplados a proteína G (GPCRs) induce a la transactivación del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) a través de varios mediadores, que incluyen SRC cinasas, Ca²⁺, proteína-cinasa C (PKC) y PKA. La activación de estas vías de señalización lleva a la generación del factor de crecimiento epidérmico unido a heparan (HB-EGF), que se produce por la escisión de proHB-EGF por la acción de las metaloproteinasas (MMP). La liberación del HB-EGF activa al receptor para EGF que a su vez lleva a la activación de la vía de transducción de la proteína-cinasa activada por mitógenos (MAPK), para promover la expresión génica y la proliferación celular (Lappano and Maggiolini, 2011).

6. EL RECEPTOR SENSOR DE CALCIO EXTRACELULAR

El ion calcio (Ca²⁺) es crucial para el control de muchas funciones celulares importantes como la proliferación, la diferenciación, la integridad de la membrana plasmática, cofactor para proteínas y moléculas de adhesión, factores de coagulación, secreción de enzimas y de fluidos (Tharmalingam and Hampson, 2016). El calcio en organismos multicelulares complejos juega un papel clave tanto en los compartimentos intracelulares como extracelulares. Por mucho tiempo se consideró al Ca²⁺ principalmente como un segundo mensajero ya que modula los componentes de señalización molecular. Sin embargo, en 1993, el Dr. Edward M. Brown clonó a partir de glándulas paratiroideas bovinas el Receptor Sensor de Calcio (CaSR) y lo identificó debido a la capacidad del CaSR para regular la secreción de hormona paratiroidea (PTH) en respuesta a cambios en el calcio extracelular libre (Ca²⁺), regulando así la homeostasis del calcio en el organismo. El descubrimiento de este definió

un papel adicional del Ca^{2+} como primer mensajero. El CaSR es un GPCR que pertenece a la familia C, comparte una gran región amino terminal extracelular que sirve para detectar sus respectivos ligandos. Se ha demostrado que el CaSR une y señala en respuesta a concentraciones extracelulares de Ca^{2+} . También puede ser activado por una variedad de otros cationes divalentes, trivalentes y compuestos catiónicos como aminoácidos, espermina y ciertos antibióticos. El CaSR está presente en diversos tejidos no homeostáticos, por ejemplo, cerebro, piel, etc. (Brown y MacLeod, 2001; Ward et al., 2002; Kim and Wysolmerski, 2016). Además de su papel como un regulador principal del metabolismo del calcio, también se ha demostrado su participación en la regulación de diversos procesos, como la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis, la secreción de hormonas, la expresión génica y el transporte iónico en muchos órganos diferentes (Leach et al., 2014; Tharmalingam and Hampson, 2016).

6.1. Estructura del CaSR

El gen del CaSR está ubicado en el cromosoma 3q13.3-21 y tiene una región codificante de 3,234 pb distribuida en seis exones en el locus de aproximadamente 100 kb. Este gen codifica para una glicoproteína de 1,078 aminoácidos con un peso molecular de entre 150-160 kDa. Contiene 11 sitios de glicosilación en su región amino terminal extracelular, estas glicosilaciones no parecen ser crucial para la función de CaSR, sino más bien para el plegamiento adecuado y el tráfico de este receptor (Hu and Spiegel, 2007).

El CaSR como GPCR está conformado por 4 dominios principales: la región amino terminal que consta de un dominio extracelular de 612 aminoácidos (ECD) y un dominio rico en cisteína (CRD) que une el ECD al primer dominio transmembrana, el dominio heptahélico transmembranal de 250 aminoácidos (TMD) conectado por tres asas extracelulares y tres asas intracelulares y por último una región carboxilo terminal intracelular de 216 aminoácidos (ICD) (Fig. 5) (Alfadda et al. 2014; Zhang et al. 2016).

El dominio extracelular del CaSR, se caracteriza por formar una estructura de atrapa moscas o "*Venus fly trap-like*" (VFT, por sus siglas en inglés), que consiste en dos lóbulos denominados lóbulo 1 y lóbulo 2 del ECD. Este dominio puede sufrir cambios en la conformación una vez que se une el ligando, el cual tiene 2 estados, abierto (sin ligando, inactivo) o cerrado (con ligando, activo). A través del ECD, el CaSR forma homodímeros o heterodímeros mediante interacciones no covalentes con otros GPCR de clase C, incluidos los receptores metabotrópicos de glutamato (mGLUR) o los receptores gamma-

aminobutírico B (GABA B). La formación de homodímeros de CaSR se da en el VFT por sus de cisteínas C129 y C131 que forman puentes de disulfuro (Ray, 2015; Alfadda et al. 2014; Conigrave and Ward, 2013).

Por otro lado, se ha demostrado que el VFT tiene de tres a cinco sitios de unión al calcio, aunque el calcio representa el ligando fisiológicamente relevante para el CaSR *in vivo*, una serie de cationes divalentes, trivalentes, polivalentes (La^{3+} , Gd^{3+} , Be^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} y Mg^{2+}) L-aminoácidos, poliaminas como la esperimina, polipéptidos y antibióticos pueden activar el CaSR *in vitro* (Magno et al., 2011; Ferre et al. 2012). Con respecto a los moduladores alostéricos sintéticos que incluyen calcimiméticos, como NPS-R568, Cinacalcet, Calindol y fenilalquilaminas relacionadas, y calcilíticos, como NPS-2143 y el Calhex-231, estos se unen entre el dominio heptahélico transmembranal TMD y las asas extracelulares del CaSR (Charlton, 2009; Conigrave and Ward, 2013).

El Dominio rico en cisteínas (CDR, por sus siglas en inglés) con nueve cisteínas altamente conservadas en una secuencia de aproximadamente 84 residuos de longitud como región adaptadora entre el VFT y el TMD. Este dominio tiene una estructura de varilla rígida estabilizada por puentes de disulfuro que traduce los cambios de inflexión dependientes de unión de ligando al VFT al dominio TMD. Estos cambios inducen el reclutamiento y/o activación de proteínas G heterotriméricas y otras proteínas de unión intracelular para iniciar la señalización mediada por receptor (Ray, 2007; Conigrave and Ward, 2013; Alfadda et al. 2014).

El Dominio Heptahélico transmembranal (TMD) está compuesto por 7 segmentos transmembranales conectado por 3 asas extracelulares y 3 asas intracelulares. Se ha reportado que en el TMD se encuentran los sitios de unión (sitios alostéricos) para varios moduladores alostéricos (Hu and Spiegel, 2007). La importancia de las asas extracelulares se debe a que cuando ECL2 y ECL3 son modificados con mutaciones cambian la activación del receptor tanto de manera positiva como negativa. De igual manera una modificación de las asas intracelulares (ICL1, ICL2 y ICL3) presentan una reducción en la señalización, esto debido a que estas asas intracelulares interaccionan con las proteínas G heterotriméricas (Hendy et al., 2009).

El Dominio o región Carboxilo terminal intracelular (ICD; por sus siglas en inglés) está compuesta por 216 aminoácidos y forma la porción intracelular del receptor. En este dominio intracelular se encuentran sitios consenso para la fosforilación por las cinasas PKC y PKA. Se ha observado que la fosforilación por PKC disminuye la activación de CaSR (Hu and Spiegel, 2007). La importancia del carboxilo terminal es debido que si se produce un truncamiento completo del carboxilo anula por

completo la actividad del receptor, mientras que los truncamientos menores tienen diversos efectos como la localización del receptor en la superficie celular, la transducción de señales después de la estimulación por calcio y la desensibilización del receptor después de la unión del ligando (Chen and Goodman, 2004).

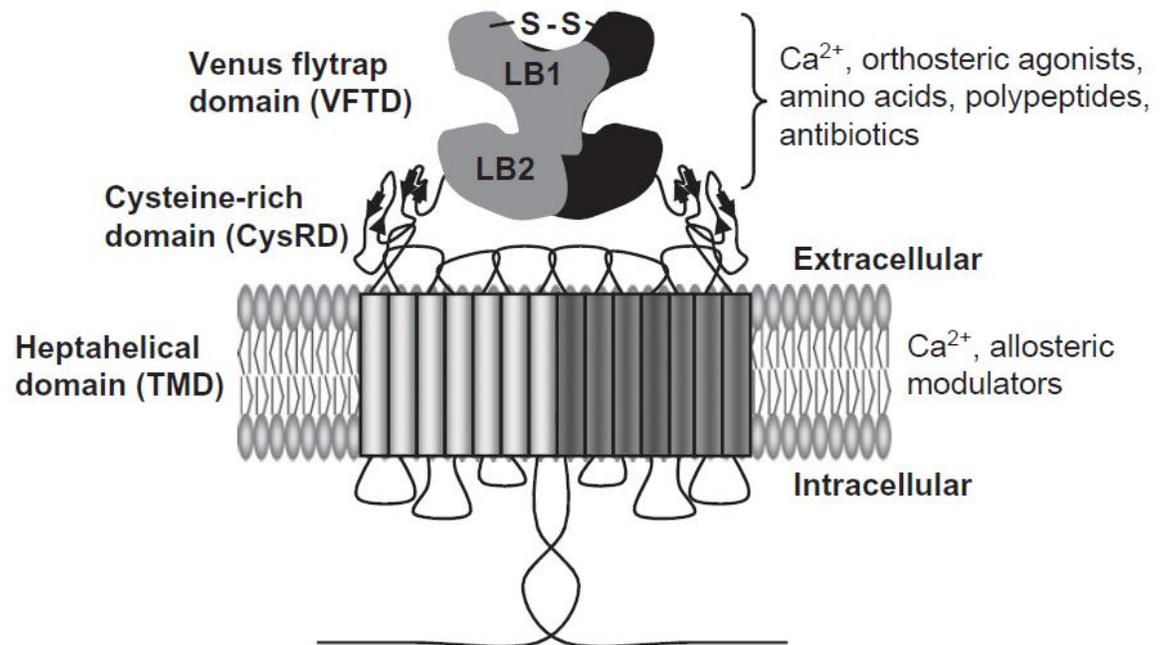


Figura 5. Esquema representativo del CaSR dimérico. Se muestran los cuatro dominios del receptor, el dominio extracelular (ECD) compuesto por el *Venus Fly Trap Like* (VFT) y el dominio rico en cisteínas (CRD), el dominio heptahélico transmembranal (TMD) y el dominio intracelular (ICD). También se muestran los sitios de unión a ligando que se encuentra en el dominio ECD y TMD (Huang et al. 2011).

6.2. Señalización del CaSR

Como miembro de la familia de clase C de GPCRs, el CaSR regula la activación de la señalización de tres grupos principales de proteínas G heterotriméricas: Gq/11, Gi/o y G12/13, y en casos como en el cáncer puede activar a Gs. Esta activación va depender del tipo celular, de la expresión de isoformas de proteínas G heterotriméricas y enzimas tales como adenilato ciclasa y PKC, así como proteínas adaptadoras que controlan el ensamblaje de los andamios de señalización.

El CaSR estimulado y acoplado a Gq/11 conduce a la activación de la fosfolipasa C_β (PLC_β) que lleva a la hidrólisis del fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato para producir diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) y a un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, estos segundos mensajeros promueven la activación de la proteín-cinasa C (PKC). La PKC activa la cascada de señalización de

la proteína-quinasa activada por mitógeno (MAPK) que finalmente da como resultado la fosforilación y activación de ERK1/2 (Hofer and Brown, 2003; Thomsen et al. 2012; Smith et al. 2016; Díaz-Soto et al. 2016; Tennakoon et al. 2016).

La activación de Gi/o mediada por CaSR da como resultado la inhibición de la adenilato ciclasa (AC) que conduce a una disminución de la conversión de ATP en cAMP y una disminución de la actividad de proteína-quinasa A (PKA) (Hofer and Brown, 2003; Thomsen et al. 2012; Smith et al. 2016; Díaz-Soto et al. 2016; Tennakoon et al. 2016). Por otra parte, el heterodímero $\beta\gamma$ activa a Ras que conduce a la activación de MAPK y fosforilación de ERK1/2 (Smith et al. 2016).

La señalización de CaSR mediada por G12/13 influye principalmente en la regulación de la forma y migración celular mediante la activación de las Rho GTPasas, la modulación de procesos implicados en el mantenimiento de la arquitectura celular y la expresión génica a través de la activación de Rho quinasa y la fosforilación del factor de respuesta sérica (SRF) (Fig. 6) (Hofer and Brown, 2003; Smith et al. 2016).

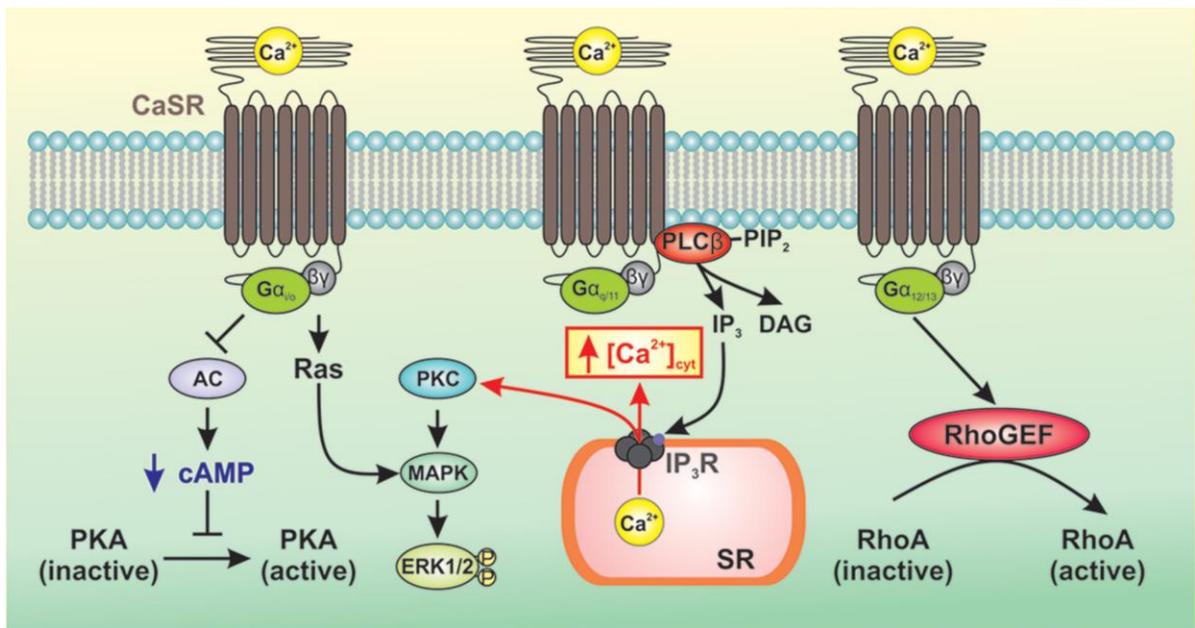


Figura 6. Representación generalizada de vías de señalización mediadas por CaSR. La señalización de las vías río abajo del CaSR son a través de tres grupos principales de proteínas G heterotrómicas, Gq/11, Gi/o, y G12/13. La activación de Gq/11 mediada por CaSR conduce a la activación de PLCβ dando como resultado la producción de IP3 que moviliza Ca²⁺ citosólico de las reservas intracelulares y la activación de PKC que lleva a la activación de la MAPK y la posterior fosforilación y activación de ERK 1/2. La activación de Gi/o mediada por el CaSR inhibe la adenilato ciclasa (AC) lo que reduce los niveles de cAMP y actividad de la PKA. Las subunidades β/γ de Gi/o activan Ras que conduce a la activación de MAPK y fosforilación de ERK1/2. La activación de G12/13 hace que Rho GEF se transloque a la membrana plasmática donde activa al GEF. Rho GEF luego activa RhoA catalizando el intercambio de GDP por GTP (Smith et al. 2016).

6.3. Papel Fisiológico del CaSR

La función principal del CaSR es la regulación de la homeostasis del calcio en el organismo, manteniendo el equilibrio entre la absorción de Ca^{2+} en el tracto gastrointestinal, la excreción de Ca^{2+} en riñones y la liberación de Ca^{2+} en hueso. El CaSR en la paratiroides detecta cambios mínimos en los niveles de calcio sérico (1.1-1.3 mM) y regula síntesis y secreción de la hormona paratiroidea (PTH). Cuando los niveles séricos de Ca^{2+} son altos, el receptor se activa e inhibe síntesis y secreción de PTH. Sin embargo, si la concentración sérica de Ca^{2+} es baja, el CaSR es inactivo y la PTH se secreta en el suero. Esto mejora la absorción de Ca^{2+} en intestino, la liberación de Ca^{2+} en hueso y reduce la excreción urinaria de Ca^{2+} hasta que se restaure la concentración sérica en el organismo. El CaSR en riñón controla la homeostasis del calcio y fósforo, el transporte de iones, la liberación de renina, y mantiene la acidificación y la concentración urinaria. En hueso, el CaSR está involucrado en el metabolismo de las células óseas, la osteogénesis y la reabsorción durante la remodelación ósea. La reducción en la secreción de calcitonina mediada por el CaSR en respuesta a un bajo contenido de calcio extracelular también se considera importante para el mantenimiento de la homeostasis del calcio. La calcitonina inhibe la resorción ósea al tiempo que aumenta la excreción urinaria de Ca^{2+} (Fig. 7) (Brown, 2013; Mannstadt et al. 2017; Hendy et al., 2009).

Aunque el papel central del CaSR es la regulación de la homeostasis del calcio, este receptor también se expresa en tejidos no calciotrópicos donde regula una multitud de procesos celulares. En el sistema nervioso central, el CaSR participa en la regulación del crecimiento de células neuronales. En las terminaciones nerviosas regula las funciones sinápticas como la plasticidad y la neurotransmisión. En la epidermis regula la adhesión y la diferenciación celular. En el páncreas media la adhesión celular, la comunicación de célula a célula y la secreción de insulina. En el sistema cardiovascular regula el tono y la presión sanguínea de los vasos sanguíneos. El CaSR también se expresa a lo largo de todo el tracto gastrointestinal, en el intestino se considera que sirve como un sensor de nutrientes. El CaSR estimula la $\text{ATPase-H}^+/\text{K}^+$, regulando la secreción de gastrina de las células G del estómago. También estimula la secreción de colecistocinina de células enteroendocrinas y la secreción de proteína morfogenética ósea. En el intestino, participa en la regulación del transporte de fluidos y el transporte intestinal de iones. La secreción de bicarbonato (HCO_3^-) en el colón se ajusta mediante el CaSR: en entornos fisiológicos estimula la secreción de HCO_3^- dependiente de cloruro y de ácidos grasos cortos, mientras que en condiciones experimentales ocasiona pérdida de HCO_3^- (Díaz-Soto et al. 2016).

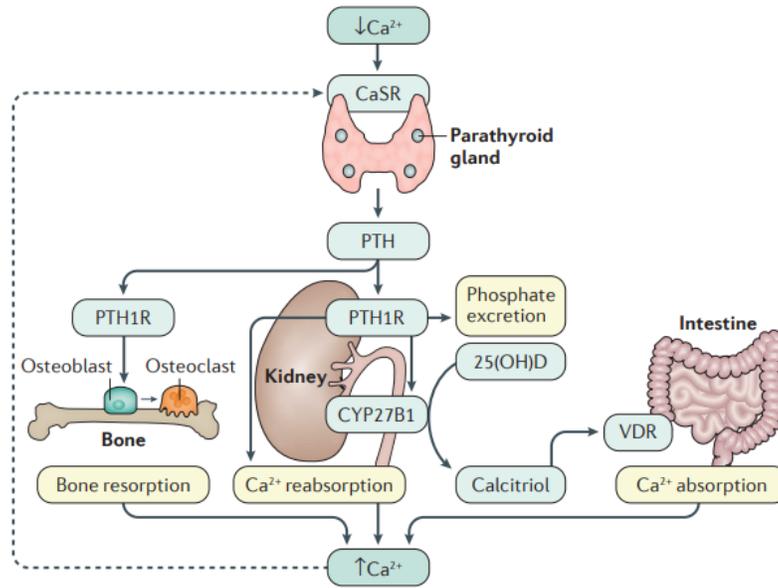


Figura 7. Papel Fisiológico del CaSR. El receptor sensor de calcio (CaSR) en condiciones de bajos niveles de calcio extracelular promueve la secreción de la hormona paratiroidea (PTH). La PTH actúa sobre el receptor PTH1 (PTH1R) en los riñones y el hueso. En hueso, la activación de PTH1R da como resultado la liberación de citocinas que estimulan la actividad de los osteoclastos, mejorando la resorción ósea y la liberación de calcio del esqueleto. En el riñón, la PTH aumenta la reabsorción tubular de calcio, la excreción de fosfato y estimula la enzima 25-hidroxit vitamina D3 α -hidroxilasa (CYP27B1) que promueve la conversión de 25-hidroxit vitamina D3 (25(OH)D3) a calcitriol. El calcitriol actúa sobre el intestino para aumentar la absorción de calcio en la dieta a través del receptor de vitamina D (VDR). El aumento en los niveles de calcio y calcitriol mediado por la PTH actúa sobre las glándulas paratiroides para inducir la activación del CaSR inhibiendo por retroalimentación la secreción de PTH (flecha punteada) (Mannstadt et al. 2017).

6.4. Enfermedades relacionadas con el CaSR

6.4.1. Trastornos de la homeostasis del calcio relacionados con el CaSR

Los trastornos en la regulación del Ca^{2+} fisiológicos resultan de anomalías en la estructura, nivel de expresión y/o función del CaSR o de sus componentes de señalización río abajo. Se han reportado más de 230 mutaciones diferentes de línea germinal en el gen CaSR. Estas mutaciones en el pueden causar una pérdida de la función de CaSR y dar lugar a trastornos hipercalcémicos tales como la hipercalcemia hipocalciúrica familiar (FHH1, por sus siglas en inglés), hiperparatiroidismo severo neonatal (NSHPT, por sus siglas en inglés) e hiperparatiroidismo primario (HPTP, por sus siglas en inglés); o conducir a una ganancia de función que está asociada con trastornos hipocalcémicos tales como hipocalcemia autosómica dominante tipo 1 (ADH1) y síndrome de Bartter tipo V (Mayr et al 2016; Hannan et al. 2016).

Hasta la fecha, se han identificado más de 50 mutaciones sin sentido inactivantes en FHH / NSHPT y están agrupados en la porción de la región amino terminal del dominio VFT, el dominio rico en cisteínas

(Cys) y el dominio TM. Se han identificado pocas mutaciones inactivantes en la región de la tercera asa intracelular o en la región del carboxilo terminal distal, lo que concuerda con los hallazgos de los experimentos *in vitro* de que la eliminación de la mayoría de los residuos en estas regiones no afecta la expresión y la función del receptor. Por otro lado, hay dos grupos característicos de mutaciones activantes asociadas a ADH en la secuencia de CaSR, uno se ubica en la región de la segunda asa del dominio VFT y el segundo grupo de mutaciones reside en los segmentos transmembranal 5, 6 y 7 lo que sugiere que el movimiento de estas hélices entre sí podría ser un evento crucial en activación de CaSR (Hu and Spiegel, 2007).

6.5. El CaSR en cáncer

En múltiples tipos celulares incluidas las células epiteliales del intestino, mama y ovarios, así como en los queratinocitos, pequeños cambios en la concentración extracelular de Ca^{2+} son capaces de inducir un cambio en el destino celular. Ya que el CaSR regula los procesos del destino celular incluida la secreción de hormonas, el control de la proliferación, la diferenciación, la apoptosis, la quimiotaxis y la migración. Como se sabe el cáncer es una enfermedad de cambios dramáticos en estos procesos celulares, no es sorprendente que el CaSR pueda estar involucrado en dichos cambios fenotípicos y que contribuya a la progresión de la enfermedad neoplásica. Aunando a que el CaSR es el segundo GPCR mas mutado en cáncer de acuerdo con un análisis bioinformático en la base de datos COSMIC (O'Hayre et al. 2013). Sin embargo, el CaSR puede funcionar como un oncogén o un gen supresor tumoral dependiendo del origen y sitio del cáncer, ya que se ha informado que puede prevenir el cáncer en algunos tejidos mientras lo promueve en otros (Fig. 8) (Tennakoon et al. 2016).

Un ejemplo del comportamiento como gen supresor de tumores es en la glándula paratiroides, el tejido más importante con respecto a la homeostasis de Ca^{2+} extracelular, la activación del CaSR previene la proliferación celular e induce la diferenciación terminal de las células. En consecuencia, la pérdida del CaSR es una característica observada en tumores paratiroides. Otro ejemplo es en el colon ya que el epitelio de colon normal, el calcio inhibe la proliferación e induce la diferenciación. Después de la identificación del CaSR en las células intestinales se sugirió que los efectos antiproliferativos del calcio estaban mediados, al menos en parte, por este. El CaSR se expresa en la mucosa del colon normal, sin embargo, en adenomas tempranos y en los adenomas avanzados su expresión ya está disminuida y se pierde en los tumores indiferenciados de la última etapa. Esta podría ser la razón por la cual, durante la carcinogénesis del colon, el calcio es ineficaz o incluso promueve el tumor (Brennan et al. 2013; Díaz-Soto et al. 2016; Tennakoon et al. 2016).

Por otro lado, el CaSR puede ser oncogénico, en varios tipos de cáncer como el de próstata, el testicular, el ovárico y el de mama. El CaSR parece actuar como un oncogén a menudo promoviendo la proliferación e inhibiendo la apoptosis. Sin embargo, los mecanismos aún no se comprenden por completo. Se ha obtenido evidencia que en el cáncer de próstata y carcinomas de células renales el CaSR actúa también de manera oncogénica. Curiosamente, en el caso de cáncer de próstata, que produce metástasis a hueso, la expresión del CaSR parece ser mayor en la metástasis ósea que en el tumor primario, además, el Ca^{2+} extracelular elevado promueve la proliferación en las células metastásicas óseas en este tipo de cancer. Estos efectos disminuyeron después de que se depletará el CaSR (Liao et al., 2006). En los carcinomas de células renales, solo el 30-40% de los casos se metastatizan al hueso. Notablemente, la expresión del CaSR es mayor en los tumores renales primarios con metástasis óseas que en los pacientes con tumores con metástasis pulmonares o sin metástasis. Adicionalmente, el Ca^{2+} extracelular promueve la proliferación celular solo en tumores de pacientes con metástasis ósea; concordando con la inhibición de los efectos de la proliferación del Ca^{2+} extracelular usando calcilíticos del CaSR (Joeckel et al., 2014).

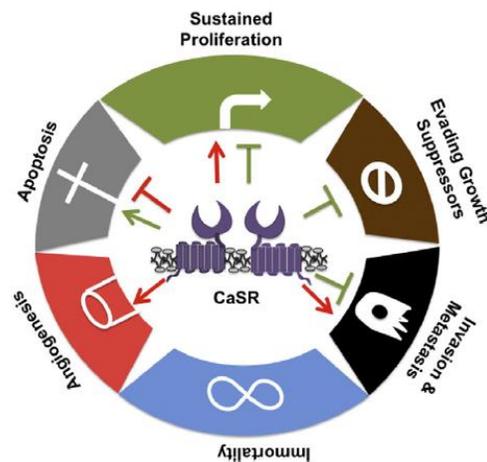


Figura 8. El receptor sensor de calcio y los hallmarks del cáncer. Dentro de las características distintivas del cáncer según lo definido por Hanahan y Weinberg. Las flechas representan el papel oncogénico (en rojo) y el papel supresor tumoral (en verde) del CaSR (Tennakoon et al. 2016).

6.6. El CaSR en mama

La primera documentación de la expresión de CaSR en tejido mamario normal fue informada por Cheng et al. (1998). Donde demostró la expresión de ARNm y la proteína de CaSR en células epiteliales ductales en el seno humano. Estudios posteriores en ratones confirmaron estas observaciones y demostraron que los niveles de ARNm de CaSR en la glándula mamaria de ratón son

bajos durante el desarrollo ductal, aumentado a principio y en la mitad del embarazo, y durante la lactancia hay un pico de expresión (VanHouten et al., 2004).

En ratones lactantes, el receptor se expresa principalmente en la superficie basolateral de las células ductales y alveolares, así como dentro del compartimento intracelular de estas mismas células (VanHouten et al., 2004, 2007).

La función del CaSR en tejido mamario es la de regular la secreción del péptido parecido a la hormona paratiroidea (PTHrP, por sus siglas en inglés), esto para promover la salida de calcio intracelular y suplementar la leche materna durante la lactancia, este proceso se lleva a cabo de la siguiente manera: Cuando el CaSR se activa en la mama lactante promueve el transporte de calcio trans-epitelial a la leche mediante el aumento de la actividad de la bomba de calcio, PMCA2. Por otro lado, la activación del CaSR suprime la liberación de PTHrP en la leche y en la circulación sistémica. Sin embargo, cuando el CaSR no está activo por la disminución de la concentración de calcio, hay una secreción del PTHrP circulante que actúa sobre los osteoblastos (Ob) para aumentar el desarrollo y la actividad de los osteoclastos (Oc) a través de la vía RANK/RANKL. Esto, a su vez, estimula la resorción ósea y libera reservas de calcio esquelético. El PTHrP también actúa sobre el riñón para estimular la reabsorción de calcio. De esta manera, el CaSR ayuda a mantener un suministro constante de calcio para la producción de leche (Kim and Wysolmerski, 2016; VanHouten and Wysolmerski, 2013).

6.7. El CaSR en cáncer de mama

La mama es un órgano con una función fisiológica de transporte vectorial de Ca^{2+} durante la lactancia, lo que resulta en la generación de leche que contiene aproximadamente 200 mg de Ca^{2+} diariamente en madres lactantes. Por lo tanto, no es sorprendente que el CaSR se exprese en células mamarias sanas y malignas y que regule diversas funciones en este tejido.

El CaSR se expresa tanto en la glándula mamaria normal como en la cancerosa. La expresión en cáncer de mama se confirmó en un estudio clínico de Mihai et al., donde mostró que los niveles del CaSR son elevados en células de cáncer de mama altamente metastásicas. De los pacientes con cáncer de mama con fuerte expresión de CaSR, 13 de 15 tenían metástasis óseas, mientras que solo dos de 23 pacientes con una exploración ósea normal expresaron altos niveles de CaSR, lo que sugiere que la CaSR puede contribuir a la metástasis preferencial de las células de cáncer de mama al hueso. Otros estudios han demostrado que las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 totalmente transformadas tienen niveles de CaSR más altos que las líneas de células

mamarias no malignas, como las células Hs578Bst y MCF-10A (Mihai et al., 2006; Huang et al., 2009; VanHouten and Wysolmerski, 2013).

Como se mencionó anteriormente, en células epiteliales mamarias normales, la activación del CaSR durante la lactancia inhibe la síntesis y secreción de PTHrP. Sin embargo, en células de cáncer de mama, el CaSR estimula la secreción de PTHrP de una manera dependiente de cAMP. Esta función contradictoria es posible debido a la capacidad del CaSR para acoplarse diferencialmente a las proteínas G, en este caso, de un acople a Gai que lleva a la supresión de los niveles de cAMP en las células mamarias normales, por el acople a Gas que promueve a un aumento en los niveles de cAMP en células de cáncer de mama lo que lleva a la secreción del PTHrP, este péptido induce el recambio óseo o osteólisis, incluida la formación y actividad de los osteoclastos. El recambio óseo induce la secreción de más Ca^{2+} en el organismo volviendo a activar al CaSR y aumentando a la osteólisis o el recambio óseo. Por otro lado, también contribuye al aumento de la liberación de los factores quimioatrayentes tales como $\text{TGF}\alpha$, IGF-I, IGF-II y factor de crecimiento derivado de plaquetas, promoviendo la metastásis y el aumento de la supervivencia, proliferación y migración celular. A este fenómeno se le llama ciclo osteolítico vicioso (Fig. 9) (Saidak et al. 2009; Kim and Wysolmerski, 2016; Tennakoon et al. 2016).

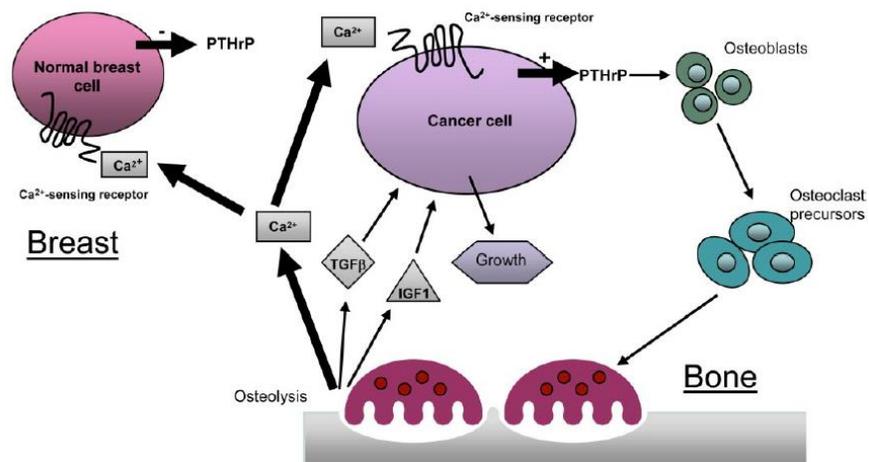


Figura 9. El círculo osteolítico vicioso en el cáncer de mama metastásico en el hueso. Los factores liberados durante la osteólisis o recambio óseo, como el Ca^{2+} actúan sobre las células malignas en el microambiente tumoral, promoviendo la liberación de agentes que estimulan la degradación ósea, la liberación de Ca^{2+} adicional y la secreción de otros factores que estimulan la secreción de PTHrP. Esto resulta en un círculo vicioso. Por el contrario, la estimulación del CaSR en células de mama normales conduce a la inhibición de la secreción del PTHrP (Saidak et al. 2009).

Hasta el momento se ha descrito la contribución del CaSR en la secreción de la PTHrP, sin embargo, este receptor posee la capacidad de promover la secreción de factores quimiotácticos y angiogénicos. En nuestro laboratorio recientemente se demostró que el CaSR tiene la capacidad de inducir la secreción de factores angiogénicos y quimiotácticos como GM-CSF, EGF, MDC/CCL22, FGF-4 e IGFBP2 en líneas celulares de cáncer metastásico y que esta secreción se encuentra regulada por la vía $G\beta\gamma$ -PI3K-AKT-mTOR y la vía de las MAPK, así como por la transactivación de la vía de señalización del EGFR (Hernandez-Bedolla et al. 2015). Por otro lado, Saidak *et al.* en 2009 reportaron que cuando el calcio extracelular activa al CaSR induce migración en células de cáncer de mama, este evento celular posteriormente fue caracterizado en nuestro laboratorio y al parecer esta migración inducida por el CaSR es regulada por la vía de $G\beta\gamma$ -PI3K-AKT-mTOR (Datos aun no publicados).

Como ya se había mencionado anteriormente que el CaSR es uno de los GPCRs más mutados en el cáncer, para el caso del cáncer de mama se han encontrado 19 mutaciones *missense* o mutaciones contrasentido (de acuerdo a la base de datos COSMIC, https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?all_data=&coords=AA%3AAA&dr=&end=1079&gd=&id=56913&ln=CASR&seqLen=1079&sn=breast&start=1#ts) encontradas en muestras de pacientes, estas mutaciones se caracterizan en un cambio de una sola base dentro de un codón, produciendo un cambio de aminoácido, alterando la secuencia proteica en el CaSR. Sin embargo, estas mutaciones pueden ser conservativas, en donde el aminoácido cambiado por la mutación posee la misma naturaleza química al aminoácido sustituido, o bien, también puede ser no conservativo en el que el aminoácido posee una naturaleza química diferente al original aumentando la posibilidad de alterar la función de la proteína (Fig. 10).

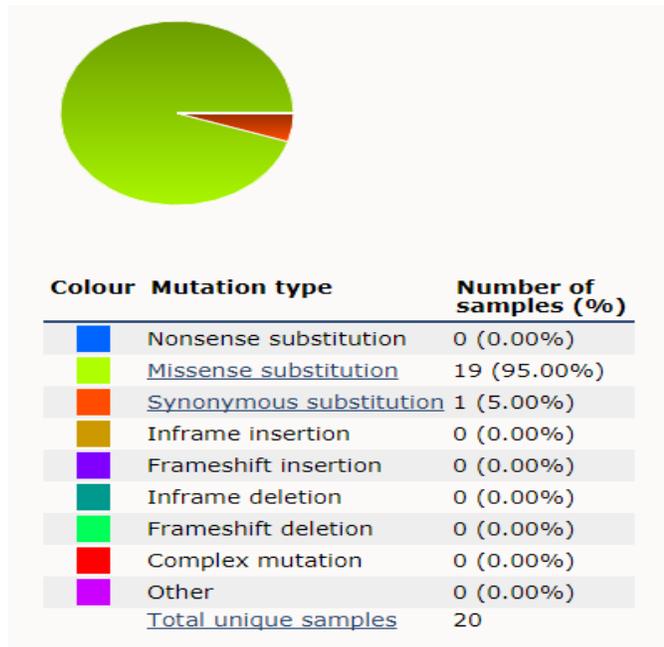


Figura 10. Mutaciones del CaSR presentes en cáncer de mama. En la base de datos COSMIC se encuentran registradas hasta el momento 20 mutaciones en el gen de CaSR en cáncer de mama de muestras de pacientes con esta patología.

En el laboratorio se interesó por determinar el efecto de mutaciones en el gen del CaSR encontradas en pacientes con cáncer de mama, por lo que se escogieron 4 mutaciones que se encuentran distribuidas tanto en la primera asa intracelular, como en el dominio transmembrana y en la región del carboxilo terminal, debido a que estos dominios están relacionados con la interacción de las proteínas G heterotriméricas que desencadenan la señalización río abajo por la acción del CaSR. Por lo que se generaron las mutantes CaSR_{N639K}, CaSR_{T732A}, CaSR_{R886Q} y CaSR_{V894I} por mutagénesis dirigida, se expresaron estas mutaciones y se compararon las vías de señalización que activan con respecto al receptor silvestre CaSR_{Silvestre} (Hidalgo Moyle, 2014). También se caracterizó posteriormente la activación de las GTPasas Rac y Cdc42 por acción de estas mutantes y se compararon con el CaSR silvestre (Orduña Castillo, 2016).

JUSTIFICACIÓN

El CaSR participa en diferentes procesos celulares como la homeostasis del Ca^{2+} , proliferación, supervivencia, diferenciación, secreción de factores y migración celular por lo que es importante conocer los mecanismos moleculares involucrados ya que estos procesos se encuentran alterados o no regulados en padecimientos como en el cáncer. Por otro lado, alteraciones genéticas en el CaSR también se han asociado a la progresión de este padecimiento. Por un análisis bioinformático en la base de datos COSMIC (*catalogue of somatic mutations in cancer*) encontramos la existencia de 522 mutaciones en este receptor (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=CASR#dist>), 20 de ellas detectadas en tejido canceroso mamario.

En el laboratorio se generaron cuatro de las veinte mutantes del CaSR, las cuales son CaSR_{N639K}, CaSR_{T732A}, CaSR_{R886Q} y CaSR_{V894I} para estudiar las vías de señalización por G α . Resultados preliminares demuestran por ensayos de activación de la vía de ERK 1/2 que la mutante CaSR_{N639K} posee un switch en el acoplamiento de las proteínas G α , ya que se acopla a G α_q , G α_i y G α_s (Hidalgo Moyle, 2014; Orduña Castillo, 2016).

Debido a que la mutación N639K se encuentra en la primera asa intracelular del receptor, que posee el cambio de acople en las proteínas G α y que existen pocos estudios sobre la participación de esta asa intracelular en la señalización, creemos que la mutante CaSR_{N639K} también pudiera comprometer la señalización con el heterodímero G $\beta\gamma$. Ya que en el caso del receptor para tirotropina se demostró que aminoácidos en la primera asa intracelular coordinan la interacción con la proteína G α_q y G $\beta\gamma$. De manera que la mutación N639K pudiera alterar la vía de G $\beta\gamma$ -PI3K-AKT-mTOR, promoviendo una activación de manera diferencial de esta vía comparada con el CaSR silvestre, que lleve a una alteración en los efectos funcionales como la secreción de factores quimiotácticos. Por lo que en este trabajo decidimos estudiar la vía de señalización de G $\beta\gamma$ -PI3K-AKT-mTOR en la mutante CaSR_{N639K}.

HIPÓTESIS

La mutación N639K en el CaSR encontrada en cáncer de mama posee una alteración en la vía de señalización Gβγ-PI3K-AKT-mTOR afectando la secreción de citocinas y quimiocinas.

OBJETIVO GENERAL

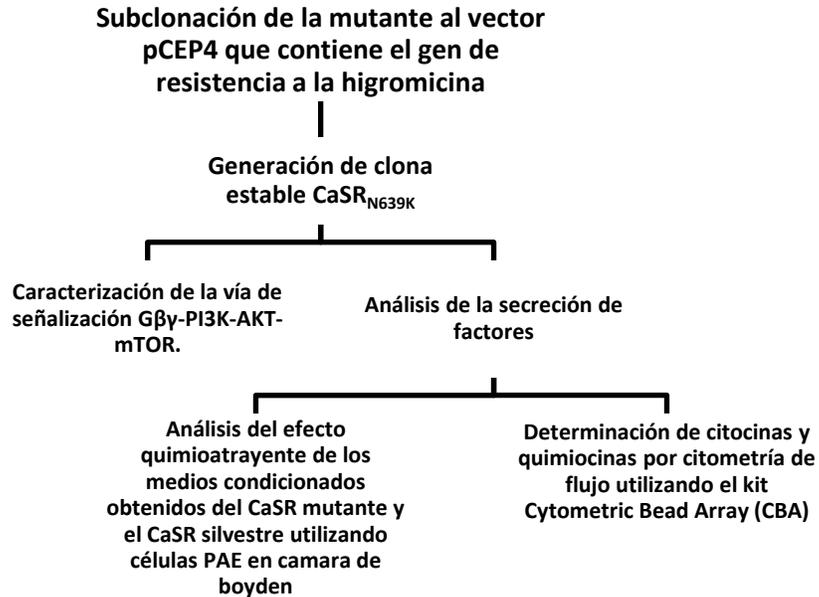
Caracterizar la vía de señalización Gβγ-PI3K-AKT-mTOR de la mutante CaSR_{N639K} identificada en muestras de cáncer mama y compararla con el CaSR_{Silvestre}.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Estudiar los efectores de la vía de señalización Gβγ-PI3K-AKT-mTOR activada por la mutante CaSR_{N639K} y el CaSR_{Silvestre}.
- Determinar el efecto funcional en la secreción promovida por la mutante CaSR_{N639K}

METODOLOGÍA

Para poder abordar los objetivos particulares se diseñó la siguiente metodología experimental, que se representa a continuación en un diagrama.



Transfección estable de la mutante CaSR_{N639K} en células HEK-293

En nuestro laboratorio se tiene el plásmido de la mutante CaSR_{N639K} dentro del vector pCEP4, este vector está indicado para realizar transfecciones estables y posee un gen de selección que es de resistencia a higromicina, por lo que se prosiguió a realizar la transfección estable en células HEK-293, esta línea celular de riñón de embrión humano se utiliza en el estudio del CaSR ya que de manera endógena estas células no expresan las formas maduras del receptor lo que nos permite realizar estudios con el CaSR transfectado. La transfección estable fue realizada con Lipofectamina 18324-020 (*Invitrogen*), este es un liposoma catiónico que forma complejos con moléculas de ácido nucleico cargadas negativamente para permitirles superar la repulsión electrostática de la membrana celular.

1. Veinticuatro horas antes de la transfección, se sembró en una caja de 60 mm células HEK-293. Las células deben estar al 40-60% de confluencia.
2. La mezcla de transfección se preparó: mezclando la solución A y B.
 - A) Para la solución A, 2 µg de DNA se diluyeron en 100 µl de Opti-Mem 1 (*Invitrogen*) y se mezcló cuidadosamente en un tubo de propileno de 1.5 ml. Por otro lado, el *Reagent Plus*

(*Invitrogen*) se Homogenizó antes de usar y se le agregó 8 µl al tubo con el DNA, se mezcló e incubó por 15 minutos a temperatura ambiente (dentro de la campana).

B) Para la solución B, en otro tubo nuevo de propileno de 1.5 ml se diluyó 12 µl de Lipofectamina (*Invitrogen*) en 100 µl de Opti-Mem 1.

3. Pasado el tiempo de incubación del tubo A, se mezclaron los tubos A y B cuidadosamente y se incubaron a temperatura ambiente durante otros 15 minutos más (dentro de campana).
4. Las células se lavaron con 2 ml de PBS y después con 2 ml de Opti-Mem.
5. Posteriormente se le agregaron 1.8 ml de Opti-Mem 1 al tubo con el Mix de transfección y se agregó cuidadosamente por goteo a las cajas de 60 mm con células HEK-293. Las cajas se incubaron durante 24 horas a 37°C en 5% CO₂.
6. Pasadas las 24 horas las células se recuperaron agregando 2 ml de medio de cultivo DMEM (*Gibco*) con SFB al 10% y antibióticos (Penicilina, sulfato de estreptomicina y anfotericina B, *Gibco-15240-062*) (sin aspirar el medio de transfección) y se incubaron 16 horas adicionales a 37°C en 5% CO₂
7. Después de las 16 horas se preparó el medio de selección: DMEM + SFB + Antibióticos + 200 µg/ml de Higromicina (2 ml para 500ml) (*Invitrogen*). A una caja de 100 mm marcada como *POOL* se le agregaron 7 ml del medio de selección.
8. La caja de 60 mm con las células transfectadas se tripsinizó, para esto primero se lavaron con 2 ml de PBS (una vez), se aspiró el PBS y se le agregó 0.5 ml de tripsina-EDTA, la caja se incubó de 1-2 minutos a 37°C. Para neutralizar la tripsina se le agregó 4 ml de medio de selección.
9. Posteriormente, a la caja marcada como *POOL* se le agregó un inóculo de 4.5 ml de la suspensión de células. A esta caja se le cambió el medio de selección cada 24 horas hasta que llegó a confluencia. Posteriormente las células se tripsinizaron y se dividieron en 2 cajas de 100 mm, una para realizar experimentos y expandir para congelar células y la otra para congelar células para tener un banco de respaldo.

Expresión de hCaSR silvestre (CaSR_{Silvestre}) y la mutante CaSR_{N639K} en células HEK-293.

Después de realizar la transfección estable en las células HEK-293 con el cDNA que codifica para el CaSR_{N639K} se tuvo que evaluar la expresión para determinar si la transfección fue exitosa y compararla con la del CaSR_{Silvestre}. En el laboratorio se tiene una línea celular de HEK-293 que expresa

establemente el CaSR_{silvestre} llamada Clona 7, la cual se utilizó para compararla con la mutante. Por otra parte, además de comprobar la expresión del CaSR, analizamos si su expresión no se altera al estimular al receptor, por lo que consideramos condiciones de estímulo con el medio *MIX* (que contiene 375 ml de medio DMEM sin CaCl₂ y 125 ml de medio DMEM sin bicarbonato de calcio). Este medio *MIX* contiene 0.45 mM de CaCl₂ para después ajustarse agregando CaCl₂ para alcanzar una concentración final de estímulo de 1.5 mM más el calcimimético R-568.

1. Se sembraron células de las clonas estables del CaSR_{Silvestre} y la clona CaSR_{N639K} en cajas de 60 mm, se ayunaron durante 16 horas en medio bajo calcio (este medio se prepara agregando CaCl₂ al medio DMEM sin calcio) a 37°C.
2. Después transcurridas las 16 horas de ayuno, el medio bajo calcio de las cajas se aspiró por vacío y se lavaron con PBS 1X. Se colocó el estímulo de 1.5 mM en medio *MIX* más 1 µM del calcimimético R-568. Las cajas se incubaron durante 5 minutos en atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C.
3. Antes de lisar las células primero se preparó el Buffer de lisis B 1X, al cual se le agregó inhibidores de proteasas y fosfatasa (Aprotinina [1 µl/ml]; Leupeptina [1 µl/ml]; Ortovanadato de sodio [1 µl/ml]; Fluoruro de sodio [1 µl/ml]; β-glicerol fosfato [10 µl/ml] y PMSF [10 µl/ml]) y se conservó en hielo hasta su uso.
4. Después del estímulo las cajas se colocaron sobre una cama de hielo (4°C) e inmediatamente se les retiró el medio, se lavaron con PBS 1X, seguido se agregó 350 µl del buffer de lisis B 1X con los inhibidores y se incubaron durante 10 minutos sobre el hielo.
5. Al pasar los 10 minutos de incubación, se indujo la lisis celular de manera mecánica con el uso de gendarmes, se recuperó el lisado en un tubo de 1.5 ml y se volvió a inducir la lisis pasando el lisado 10 veces por una jeringa de 1 ml con aguja de 0.7 mm de diámetro.
6. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 16,100 × *g* a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante del lisado se transfirió a otro tubo de 1.5 ml y se desechó el pellet celular.
7. Las proteínas en el lisado se cuantificaron por el método de Lowry con el *kit Bio-Rad DC protein Assay*.
8. De acuerdo a la cuantificación, se prepararon los lisados con buffer de muestras 4X ajustando los volúmenes para obtener una concentración final de 1 µg/µl.

Posteriormente las muestras se sometieron a la técnica de *Western blot*, para la identificación del CaSR.

9. Para analizar la expresión del CaSR las muestras no se hirvieron y se corrieron en un gel de poliacrilamida al 8%, colocando además un marcador de peso molecular.
10. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por vía húmeda en una cámara de transferencia durante 2 horas y media a 320 mA.
11. La membrana se lavó 3 veces con TBS-Tween 1X y se bloqueó con leche al 5% en TBS-Tween 1X durante 1 hora en agitación *rocking* a temperatura ambiente.
12. La membrana se volvió a lavar 3 veces con TBS-Tween 1X y se incubó en agitación *rocking* a 4°C toda la noche con el anticuerpo primario ADD, la cual reconoce la forma madura del CaSR (1:30,000 en TBS-Tween 1X).
13. Transcurrido el tiempo la membrana se lavó 3 veces en TBS-Tween 1X y se incubó el anticuerpo secundario α -ratón (1:30,000 en leche al 5%) durante una hora en agitación *rocking* a temperatura ambiente, después de la incubación del anticuerpo secundario la membrana se lavó con TBS-Tween 1X.
14. El sustrato que se usó para revelar fue Millipore se preparó diluyendo el luminol y la peroxidasa, las membranas se bañaron durante un minuto con esta mezcla. La membrana se reveló en placas fotográficas y los datos obtenidos se analizaron por densitometría en el programa ImageJ.

Curso temporal de la activación de la vía de señalización $G\beta\gamma$ -PI3K-AKT-mTOR por el CaSR_{Silvestre} y el CaSR_{N639K}.

El objetivo de este experimento fue determinar cuál es la cinética de tiempo en la activación de los efectores de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K-AKT-mTOR, como AKT y S6, para establecer el comportamiento de activación de la vía y seleccionar el tiempo adecuado de mayor activación para utilizarlo en futuros experimentos. Los estímulos empleados fueron calcio a 1.5 mM más 1 μ M del calcimimético R-568 a diferentes tiempos (3, 5, 10 y 30 minutos) más un control negativo sin estímulo por cada clona estable: clona 7 y CaSR_{N639K}. Se obtuvieron los lisados totales y la activación de la vía se analizó por *Western blot*. Para lograr esto, se llevó a cabo lo siguiente:

1. Células de cada clona (clona 7 y CaSR_{N639K}) se sembraron en 5 cajas de 60 mm, después de 24 horas, las células se lavaron con PBS 1X y se ayunaron durante 16 horas en atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C con medio bajo calcio (0.25 mM de calcio) sin suero.
2. Después transcurridas las 16 horas de ayuno, el medio bajo calcio de las cajas se aspiró por vacío y se lavaron con PBS 1X. Se colocó el estímulo de 1.5 mM en medio MIX más 1 μ M del

calcimimético R-568. Las cajas se incubaron durante los tiempos indicados en atmosfera de CO₂ al 5% a 37°C.

3. Transcurrido los tiempos de estímulo, las cajas se colocaron a 4°C en cama de hielo, y se aspiró el medio por vacío. Las cajas se lavaron con PBS 1X, se aspiró el lavado y las células se lisaron con buffer de lisis B (que contiene inhibidores de proteasas y fosfatasas) con ayuda de un gendarme.
4. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 16,100 × *g* a 4°C durante 10 minutos, el sobrenadante del lisado se transfirió a otro tubo de 1.5 ml y se desechó la pastilla celular.
5. El lisado celular se cuantificó por el método de Lowry con el kit *Bio-Rad DC protein Assay*.
6. De acuerdo a la concentración de proteína, los lisados celulares se prepararon con buffer de muestra 4X ajustando los volúmenes para obtener una concentración final de 1 µg/µl.

Posteriormente, las proteínas se analizaron por *Western blot*, para identificar la activación de los efectores de la vía como AKT y S6 usando los anticuerpos primarios y secundario a las diluciones indicadas en la siguiente tabla (**Tabla 1**).

Tabla 1. Diluciones empleadas de anticuerpos primarios para AKT y S6 y secundarios

PROTEINA	ANTICUERPO PRIMARIO	ANTICUERPO SECUNDARIO
p-AKT S476	1: 5,000	1: 7,500 (α-conejo)
AKT	1: 5,000	1: 10,000 (α-ratón)
p-S6	1: 30,000	1: 20,000 (α-conejo)
S6	1: 5,000	1: 15,000 (α-ratón)

Efecto de los Inhibidores (NPS-2143 y Calhex) del CaSR en la señalización sobre la activación de p-AKT y p-S6.

Al determinar la cinética de activación de los efectores de la vía de Gβγ-PI3K-AKT-mTOR y determinar el tiempo de activación adecuado, se decidió determinar si esta activación depende de la estimulación del receptor por lo que se utilizaron calcilíticos NPS-2143 y Calhex tanto para el receptor silvestre

como para el receptor mutante, por lo que se consideraron 4 condiciones por cada receptor (no estimulado, estímulo, inhibición con NPS-2143 o con Calhex) (Tabla 2).

Tabla 2. Condiciones experimentales para la inhibición del CaSR

CaSR_{Silvestre} (Clona 7)	CaSR_{N639K}
No estímulo (Medio bajo calcio)	No estímulo (Medio bajo calcio)
Estímulo (1.5 mM de calcio + 1 μ M R-568) durante 10 minutos	Estímulo (1.5 mM de calcio + 1 μ M R-568) durante 10 minutos
NPS-2143 5 μ M + estímulo (1.5 mM de calcio + 1 μ M R-568) durante 10 minutos	NPS-2143 5 μ M + estímulo (1.5 mM de calcio + 1 μ M R-568) durante 10 minutos
Calhex 10 μ M + estímulo (1.5 mM de calcio + 1 μ M R-568) durante 10 minutos	Calhex 10 μ M + estímulo (1.5 mM de calcio + 1 μ M R-568) durante 10 minutos

1. Se sembraron 4 cajas de 60 mm con células de cada clona (clona 7 y CaSR_{N639K}), después de 24 horas, las células se lavaron con PBS 1X y se ayunaron durante 16 horas en atmosfera de CO₂ al 5% a 37°C con medio bajo calcio (0.25 mM de calcio) sin suero.
2. A las 15 horas de ayuno, se les dio pretratamiento a las cajas indicadas con los inhibidores (NPS-2143 5 μ M y Calhex 10 μ M) durante 1 hora.
3. Después transcurridas las 16 horas de ayuno, los medios bajo calcio de las cajas se aspiraron por vacío y se lavaron con PBS 1X. Posteriormente se le colocó el estímulo de 1.5 mM de calcio en medio MIX con el 1 μ M del calcimimético R-568 más los inhibidores del CaSR (NPS-2143 o Calhex), durante 10 minutos. Las cajas se incubaron en atmosfera de CO₂ al 5% a 37°C.
4. Transcurrido el tiempo de estímulo, se obtuvieron los lisados celulares, se cuantificaron las proteínas y las muestras se prepararon con buffer de muestra 4X, las muestras se corrieron en SDS/PAGE y se analizó la activación de los efectores de la vía, AKT y S6 por la técnica de *Western blot* usando los anticuerpos primarios y secundario a las diluciones indicadas en la Tabla 1.

Inhibición de la vía G $\beta\gamma$ -PI3K-AKT-mTOR

Al determinar que la vía G $\beta\gamma$ -PI3K-AKT-mTOR es activada por el receptor silvestre y la mutante, lo siguiente fue la inhibición de la vía activada por los dos receptores. Para analizar esto se usaron inhibidores para proteínas de señalización río debajo de G $\beta\gamma$ (Tabla 3).

Tabla 3. Condiciones de uso de inhibidores de la vía G $\beta\gamma$ -PI3K-AKT-mTOR

<i>Inhibidor</i>	<i>Molécula de señalización</i>	<i>[] de uso</i>	<i>Tiempo de pretratamiento</i>
<i>Wortmanina</i>	PI3K	300 nM	1 hora
<i>Rapamicina</i>	mTOR	40 ng/ml	1 hora

1. Se sembraron 6 cajas de 60 mm con células de cada clona (clona 7 y CaSR_{N639K}) después de 24 horas, las células se lavaron con PBS 1X y se ayunaron durante 16 horas en atmosfera de CO₂ al 5% a 37°C en medio bajo calcio (0.25 mM de calcio) sin suero.
2. A las 15 horas de ayuno, a las cajas indicadas se les dio pretratamiento con los inhibidores (Wortmanina y Rapamicina) en medio bajo calcio como indica la **Tabla 3**.
3. Transcurridas las 16 horas de ayuno, el medio bajo calcio de las cajas se aspiró por vacío y se lavaron con PBS 1X. Se les colocó durante 10 minutos el estímulo de 1.5 mM de calcio en medio *MIX* con 1 μ M del calcimimético R-568 más los inhibidores de la vía. Durante el estímulo, las cajas se incubaron a 37°C en atmosfera de CO₂ al 5%.
4. Transcurrido el tiempo de estímulo, se obtuvieron los lisados celulares, se cuantificaron las proteínas y se prepararon las muestras con buffer de muestras 4X, las muestras se corrieron en SDS/PAGE y se analizó la activación de los efectores de la vía, AKT y S6 por la técnica de *Western blot* usando los anticuerpos primarios y secundario a las diluciones indicadas en la Tabla 1.

Análisis de la secreción de factores quimiotácticos por estímulo de la mutante CaSR_{N639K} y CaSR_{Silvestre}

Después de caracterizar la vía de señalización en la clona CaSR_{N639K} y compararla con la del receptor silvestre, nosotros nos preguntamos qué efecto tendría la mutante CaSR_{N639K} en los procesos de

secreción, por lo que decidimos primero obtener medios condicionados para emplear una curva dosis/tiempo y determinar a qué concentración de calcio y a qué tiempo es el más adecuado para promover la secreción de factores quimiotácticos. Los medios condicionados se probaron en ensayos de migración en cámara de Boyden utilizando células endoteliales de aorta de porcino (PAE, por sus siglas en inglés, *Porcine Aortic Endothelial cells*). Las condiciones establecidas para este ensayo se muestran en la siguiente tabla (**Tabla 4**).

Tabla 4. Condiciones de estímulos para la curva dosis/tiempo

<i>Células</i>	<i>[] de estímulo</i>	<i>Tiempo</i>
CaSR_{Silvestre} (Clona 7)	1, 1,5 y 2 mM de Ca ²⁺ + 1 μM R-568	3 y 6 horas
CaSR_{N639K}	1, 1,5 y 2 mM de Ca ²⁺ + 1 μM R-568	3 y 6 horas

Obtención de medios condicionados de las células con el CaSR_{Silvestre} y el CaSR_{N639K}

1. Las células se ayunaron en medio bajo calcio y después se estimularon con las condiciones que se encuentra en la Tabla 4.
2. Al terminar los tiempos de estimulación, las cajas se colocaron sobre una cama de hielo y los medios condicionados se recuperaron en tubos de 1.5 ml.
3. Se centrifugaron a 16,100 × g a 4°C durante 10 minutos, el sobrenadante se recuperó y se pasaron a tubos adecuados para dializar.
4. Para la diálisis se utilizó un trozo de membrana para diálisis (*SnakeSkin® Thermo Scientific 3 kD*) de 1 cm² aproximadamente y se colocó sobre la boca del tubo de 1.5 ml, sellando el tubo con la tapa del tubo agujereada.
5. La diálisis se realizó a 4°C durante 16 horas en agitación, después los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 16,100 × g a 4°C y los medios dializados se almacenaron en -70°C hasta su uso.

Migración de células PAE en cámara de Boyden por estímulos con los medios condicionados

1. Para los ensayos de migración se usaron células endoteliales PAE. Dos cajas de 100 mm con células fueron ayunadas durante 16 horas en medio bajo calcio, lavadas con PBS 1X y tripsinizadas.
2. La suspensión celular se depositó en un tubo Falcon y se centrifugó a $852 \times g$ durante 5 minutos.
3. El sobrenadante se aspiró y el pellet celular se resuspendió con medio bajo calcio.
4. El número de células/ml se obtuvo mediante conteo de una dilución 1:10 de células en cámara de Neubauer, para después realizar alícuotas de 1,000,000 de células/ml y almacenar a 37°C en una atmosfera de CO₂ al 5%.
5. La cámara de Boyden se montó colocando en la parte inferior medios condicionados dializados, HGF 10 ng/ml como control positivo y medio bajo calcio como control negativo, teniendo cuidado de formar el menisco convexo cuando el pozo este lleno.
6. Una vez depositados los estímulos y controles, se colocó en un solo movimiento una membrana de policarbonato de 8 µM recubierta con gelatina al 2%, procurando que tenga contacto directo con los estímulos.
7. Después se colocó la parte superior de la cámara empujando firmemente hacia abajo y en los pozos superiores se añadió 100 µl de la suspensión celular de las alícuotas que contenían 1,000,000 de células/ml (100, 000 células), la cámara se incubó durante 6 horas a 37°C en una atmosfera de CO₂ al 5%.
8. Después de 6 horas de incubación la cámara se desmontó y el filtro se tomó con pinzas e inmediatamente la membrana sumergió en metanol al 100% durante 5 minutos.
9. Posteriormente, se tiñó durante 10 minutos con cristal violeta al 0.1% y se lavó el exceso de colorante con PBS 1X.
10. La membrana teñida se colocó sobre un portaobjeto y las células que no lograron migrar se limpiaron con un algodón, después se colocó otro portaobjetos de tal manera que la membrana quede entre los dos portaobjetos.
11. , La membrana se escaneo para su análisis densitométrico con los programas ImageJ y Prism6.

Determinación de la identidad de los factores quimiotácticos secretados en respuesta a la estimulación de la mutante CaSR_{Silvestre} y el CaSR_{N639K}.

Para determinar qué factores se secretan en nuestro sistema (HEK-293) y si esta secreción de factores es dependiente de la estimulación del CaSR y no de otro factor celular, decidimos emplear 3 condiciones: una no estimulada, una estimulada y una condición de estímulo más un inhibidor del CaSR durante 3 horas (Tabla 4), para después recuperar los medios condicionados y determinar los factores quimiotácticos mediante citometría de flujo empleando un kit llamado *Cytometric Bead Array* (CBA) de *BD Biosciences* que utiliza perlas que tienen adosadas anticuerpos específicos para citocinas pro-inflamatorias o quimiocinas los cuales van a capturar a las citocinas y quimiocinas, por otro lado este complejo será reconocido por anticuerpos con ficoeritrina (PE) los cuales emitirán una señal cuando son excitados por el láser del citómetro. Esta técnica tiene la capacidad de detectar y cuantificar las siguientes interleucinas inflamatorias: interleucina-8 (IL-8), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), factor de necrosis tumoral (TNF) e interleucina-12p70 (IL-12p70).

Tabla 4. Condiciones de estímulo para la obtención de medios condicionados y para la determinación de factores quimiotácticos

CaSR _{Silvestre} (Clona 7)	CaSR _{N639K}
No estímulo (Medio bajo calcio)	No estímulo (Medio bajo calcio)
Estímulo (1.5 mM de calcio + R-568) durante 3 horas	Estímulo (1.5 mM de calcio + R-568) durante 3 horas
NPS-2143 5 μ M + estímulo (1.5 mM + 1 μ M R-568) durante 3 horas	NPS-2143 5 μ M + estímulo (1.5 mM + 1 μ M R-568) durante 3 horas

Después de estimular y obtener los medios condicionados, estos se centrifugaron y se almacenaron a -70°C (sin dializar). Para determinar las citocinas, primero se tiene que correr una curva patrón para obtener la ecuación de la recta y determinar la concentración de los factores secretados.

1. El kit de citocinas inflamatorias contiene un estándar de perlas liofilizadas de citocinas que tiene una concentración de 5000 pg/ml, por lo que las perlas se tienen que reconstituir con 2 ml de diluyente y dejar 15 min a temperatura ambiente para que se hidraten.

- Después de que el estándar de citocinas inflamatorias se reconstituyó, se hacen diluciones seriadas, los tubos se etiquetan para cada una de las diluciones de la curva y se les deposita 300 µl de diluyente.
- Se tomaron 300 µl del *top standard* (tubo con la concentración más alta, 5000 pg/ml) y se depositaron al tubo etiquetado 1:2. Se resuspendió 10 veces con la pipeta; después se pasaron 300 µl al siguiente de la misma manera, al tubo 1:4 hasta llegar al último tubo 1:256. Los 300 µl finales deben desecharse (Fig. 11).

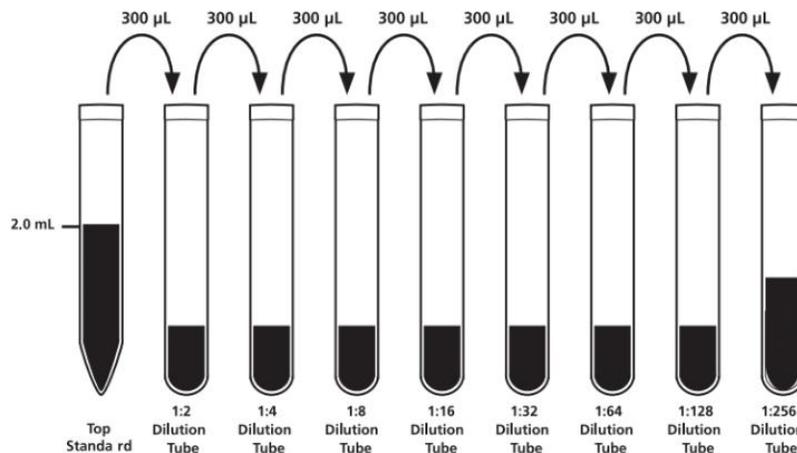


Figura 11. Dilución seriada del estándar de citocinas. Se realiza una dilución seriada para obtener diferentes concentraciones conocidas para los diferentes puntos de nuestra curva patrón (Tomada del instructivo del kit *BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines*).

- Posteriormente una vez que tenemos las diluciones del estándar de citocinas se prepara el *Bead Mix*, el cual consiste en mezclar cada vial de las perlas para cada citocina, primero se verificó el número de muestras que se tiene y se multiplicó por 2.5 (esta es la cantidad de µl que se tomará de cada interleucina del kit para mezclarla en el tubo "*Bead Mix*").
Por ejemplo: 14 muestras de la curva + 18 muestras problema \times 2.5 µl = 80 µl. Por lo tanto 80 µl se tomaron de cada citocina.

Cada botella de interleucina se mezcló con vortex durante 10 segundos y se agregó la cantidad de µl de cada perla para cada citocina al tubo marcado como "*Beads Mix*", en el ejemplo fueron 80 µl. Al terminar de agregar todas las citocinas del kit, el tubo de "*Beads Mix*" se mezcló con vortex y se agregó 15 µl de "*Beads Mix*" a un tubo nuevo de 1.5 ml por cada una de las muestras o las diluciones de la curva.

5. A estos tubos se les agregó 200 μ l de sobrenadante de cada muestra o de las diluciones de la curva.
6. Después a cada tubo se agregó rápidamente 15 μ l del reactivo de detección PE, golpear levemente con el dedo cada tubo para homogeneizar el contenido e incubar los tubos durante 3 horas a temperatura ambiente.
7. Una vez transcurridas las 3 horas, a cada muestra se les agregó 200 μ l de buffer de lavado y se homogenizó golpeando levemente con el dedo varias veces.
8. Los tubos se centrifugaron a $200 \times g$ durante 5 minutos, después de centrifugar se retiró 100 μ l del sobrenadante y se les agregó 250 μ l del buffer de lavado, se mezcló el contenido de cada tubo y al final se tomó todo el contenido para agregarlo en los tubos para el citómetro.

Se realizó el mismo procedimiento para la determinación de las quimiocinas con el kit de quimiocinas humanas *BD™ Cytometric Bead Array (CBA)* el cual podemos identificar y cuantificar interleucina-8 (CXCL8 / IL-8), RANTES (CCL5 / RANTES), monocina inducida por interferón- γ (CXCL9 / MIG), proteína quimioatrayente de monocitos-1 (CCL2 / MCP-1), y niveles de proteína-10 inducida por interferón (CXCL10 / IP-10) en una sola muestra.

RESULTADOS

Una vez generada la clona estable de la mutante CaSR_{N639K} en las células HEK-293 se analizó la expresión del CaSR para confirmar que la transfección estable haya sido adecuada y se comparó con la expresión del CaSR_{Silvestre}, (clona 7), ya que para el análisis de la caracterización de la vía de señalización se usó el CaSR_{Silvestre} para comparar el efecto con la mutante CaSR_{N639K}.

Como se observa en la Fig. 12., la expresión de la clona estable CaSR_{N639K} es semejante a la expresión del receptor silvestre. El corrimiento electroforético se realizó en condiciones reductoras y por *Western blot* se observan dos bandas en los pesos de 150 y 130 kDa que fueron reconocidas por el anticuerpo α -ADD el cual se ha reportado que reconoce el CaSR en esos pesos. La banda de 150 kDa corresponde al receptor que se encuentra en la membrana plasmática completamente procesado con N-glicosilaciones unidos a los residuos asparagina (N). Por otro lado, la banda de 130 kDa es un receptor inmaduro con un gran contenido de manosa y que se encuentra en tránsito entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (Ray and Clapp, 1998).

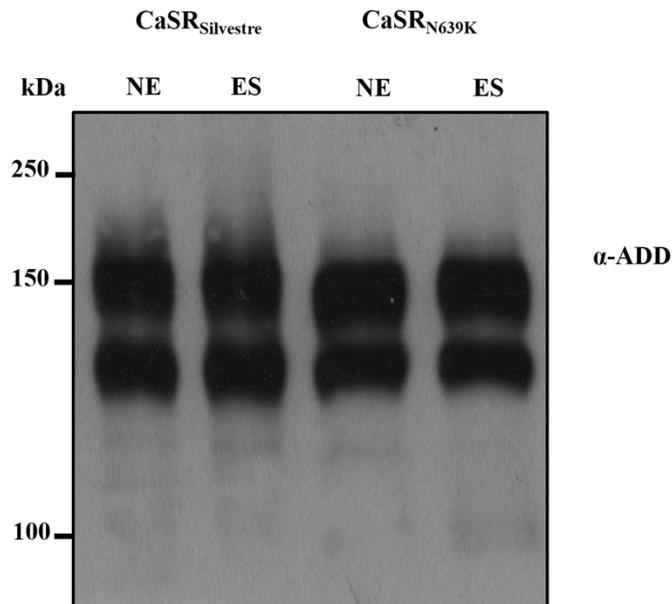


Figura 12. Expresión del CaSR_{Silvestre} y del CaSR_{N639K}. Lisados obtenidos de las clonas estables del CaSR_{Silvestre} y el CaSR_{N639K} fueron separados por electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida al 8% en condiciones reductoras (Buffer de muestra con β -mercaptoetanol). La detección del CaSR_{Silvestre} y el CaSR_{N639K} se realizó por *Western blot* utilizando un anticuerpo monoclonal α -hCaSR ADD.

Curso temporal de la activación de la vía de señalización Gβγ-PI3K-AKT-mTOR por el CaSR_{Silvestre} y el CaSR_{N639K}.

Para determinar el tiempo adecuado de activación de la vía de señalización Gβγ-PI3K-AKT-mTOR, se realizó un curso temporal de estimulación y se detectó por *Western blot* la fosforilación de los efectores (*p-AKT* y *p-S6*) tanto en el receptor CaSR_{Silvestre} como en la mutante CaSR_{N639K}.

Como se muestra en la Fig. 13, desde los 3 minutos existe una activación de AKT por estímulo de los dos receptores y se va incrementando conforme pasan el tiempo hasta alcanzar una mayor activación a los 10 minutos y empieza a disminuir a los 30 minutos. Sin embargo, al hacer el análisis estadístico se observó que hay una mayor activación del receptor silvestre desde los 3 minutos hasta los 10 minutos cuando se compara con la mutante CaSR_{N639K} dado que esta se encontró disminuida la fosforilación de AKT (Fig.13, A y C).

Por otro lado, la activación de S6 se detectó desde los 3 minutos y va aumentando, teniendo un comportamiento exponencial conforme pasa el tiempo hasta llegar a su punto máximo de activación a los 30 minutos. Igual que con AKT también se observó una significativa disminución en la activación de S6 en la mutante CaSR_{N639K}, sin embargo, a los 30 min ambos valores se igualaron (Fig. 13, B y C).

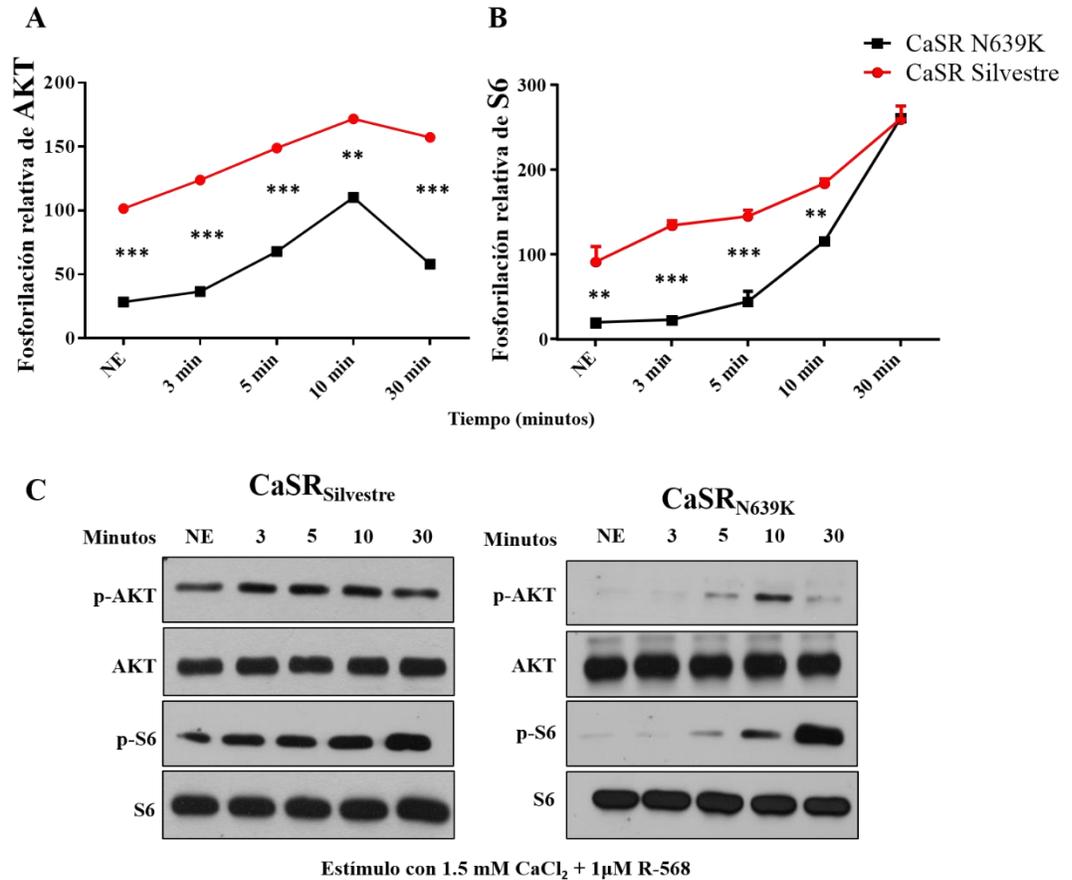


Figura 13. Curvas de activación de los efectores de la vía de Gβγ-PI3K-AKT-mTOR estimulando al CaSR_{Silvestre} y el CaSR_{N639K}. Las células fueron estimuladas con 1.5 de Ca²⁺ más el calcimimético R-568 en los tiempos indicados. Los lisados celulares obtenidos fueron sometidos a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% para después analizarse por *Western blot* utilizando anticuerpos que reconocen las formas fosforiladas y no fosforiladas de AKT y S6. Los gráficos representan SEM, (**p< 0.001, ***p<0.005) n= 2.

Efecto de los inhibidores del CaSR (NPS-2143 y Calhex) sobre la vía de señalización Gβγ-PI3K-AKT-mTOR

Después de determinar el tiempo adecuado de activación de AKT y S6, y observar que existe una diferencia en la activación de la vía entre las clonas estables, nos preguntamos si tal efecto visto es dependiente del receptor sensor de calcio y no de otro factor ajeno a este, por lo que decidimos usar calcilíticos como el NPS-2143 y el Calhex que poseen un efecto de antagonista sobre el CaSR ya que modula negativamente la actividad del receptor en presencia de calcio extracelular (Conigrave and Ward, 2013).

Como se muestra en la Fig. 14, efectivamente la fosforilación de AKT disminuyó con el NPS-2143 tanto en el CaSR_{Silvestre} como en la mutante CaSR_{N639K}, y en esta última como se puede observar la

fosforilación fue menor a la del basal. Mientras que el Calhex disminuyó la activación de AKT, pero con menor efecto si se compara con la condición del NPS-2143. Por otro lado, en el receptor CaSR_{Silvestre} se observó una disminución significativa de fosforilación en AKT con el NPS-2143 pero para la mutante CaSR_{N639K} hubo un mayor efecto de inhibición, también como se muestra en la gráfica el Calhex tuvo un mejor efecto en la mutante. Lo que corroboró que la mutante exhibe una menor activación de AKT comparado con el receptor silvestre lo que confirma lo obtenido en el experimento anterior (Fig. 14).

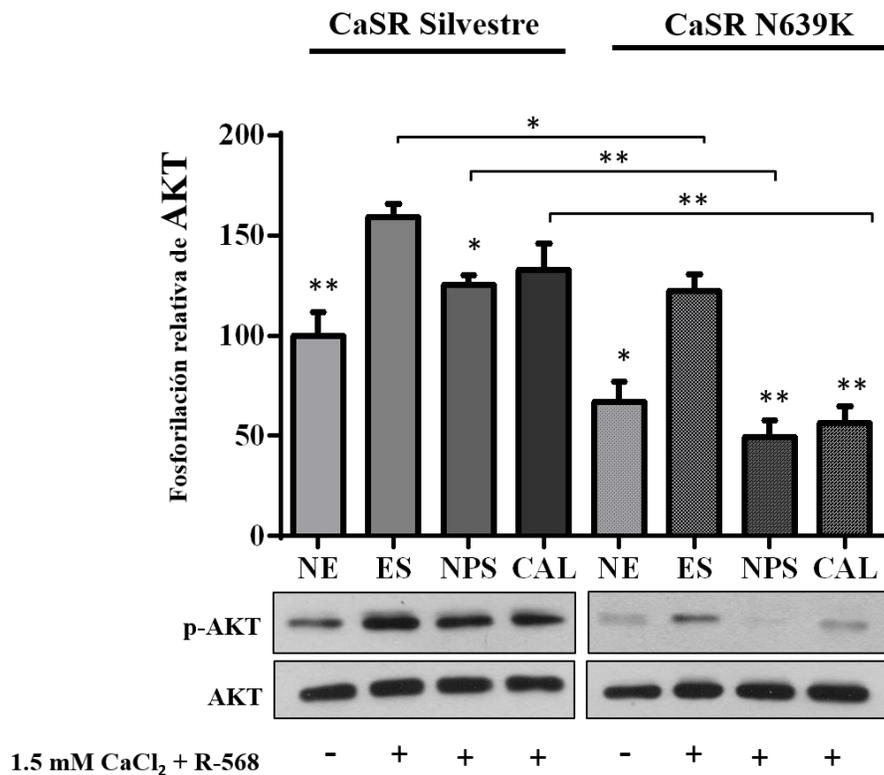


Figura 14. Efecto de los calcilíticos del CaSR en la fosforilación de AKT tanto para el CaSR_{Silvestre} como para el CaSR_{N639K}. Las clonas estables (CaSR_{Silvestre} y CaSR_{N639K}) se estimularon con 1.5 mM de Ca²⁺ y NPS-2143 5 μM o Calhex 10 μM durante 10 minutos. Para evaluar el efecto de los calcilíticos, las células fueron pretratadas durante 1 hora. Los lisados celulares fueron sometidos a electroforesis de geles de SDS-poliacrilamida al 10%. Posteriormente se detectó p-AKT y AKT por *Western blot*. NE, corresponde al no estimulado; ES, corresponde la condición estimulada; NPS, corresponde la condición con el NPS-2143; CAL, corresponde la condición con el Calhex. El gráfico muestra un análisis densitométrico de la fosforilación de AKT de tres experimentos independientes. *p<0.05, **p<0.001.

En cuanto a la activación de S6 se observó también una disminución significativa con el calcimimético NPS-2143 tanto para el receptor CaSR_{Silvestre} como para la mutante CaSR_{N639K} comparado con el estimulado sin inhibidores. Notablemente, el Calhex tiene un efecto más potente en la mutante

CaSR_{N639K} que en el CaSR_{Silvestre}. De igual manera que con AKT se observó el mismo patrón disminuido en la fosforilación de S6 en la mutante CaSR_{N639K} que en el receptor CaSR_{Silvestre} (Fig. 15). Sin embargo, en el caso de Calhex la inhibición de p-S6 no fue menor que la basal comparada con p-AKT.

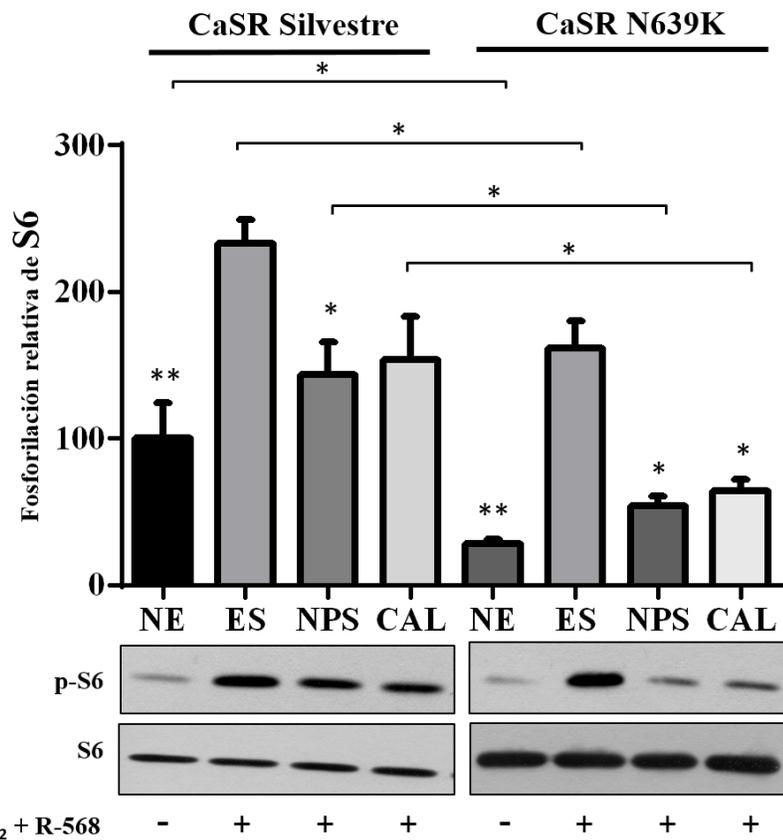


Figura 15. Efecto de los calcilíticos del CaSR en la fosforilación de S6 tanto para el CaSR_{Silvestre} como para el CaSR_{N639K}. Las clonas estables (CaSR_{Silvestre} y CaSR_{N639K}), se estimularon con 1.5 mM de Ca²⁺ y NPS-2143 5 μM o Calhex 10 μM durante 10 minutos. Para evaluar el efecto de los calcilíticos, las células fueron pretratadas durante 1 hora. Los lisados celulares fueron sometidos a electroforesis de geles de SDS-poliacrilamida al 10%. Posteriormente se detectó p-S6 y S6 por *Western blot*. NE, corresponde al no estimulado; ES, corresponde la condición estimulada; NPS, corresponde la condición con el NPS-2143; CAL, corresponde la condición con el Calhex. El gráfico muestra un análisis densitométrico de la fosforilación de S6 de tres experimentos independientes. *p<0.05, **p<0.001.

Los resultados de la Figura 14 y 15 nos demuestra dos cosas: la primera, que efectivamente la fosforilación de AKT y S6 es por la activación del CaSR, ya que este disminuye significativamente con los calcilíticos tanto en el receptor silvestre como en la mutante, y la segunda, que se confirma que la mutante N639K posee una activación disminuida de la vía.

Inhibición de la vía de transducción de señales Gβγ-PI3K-AKT-mTOR en la mutante CaSR_{N639K}

Una vez que confirmamos que la fosforilación de los efectores AKT y S6 son atribuidas a la activación del CaSR, ahora queríamos determinar si esta fosforilación es por la vía de señalización de Gβγ-PI3K-AKT-mTOR y no por otros factores independientes de la vía. Por lo que usamos inhibidores que actúan diferentes puntos de la vía de señalización como la wortmanina, un inhibidor de la PI3K y la rapamicina que se une e inhibe a mTOR. Como se muestra en la Figura 16, el tratamiento de la mutante CaSR_{N639K} con los inhibidores Wortmanina y Rapamicina provocaron una disminución significativa en la fosforilación, de AKT, excepto en la condición de estímulo con Rapamicina. Por otra parte, en la fosforilación de S6 si hubo una disminución en todas las condiciones. Esto nos indica que efectivamente la activación del CaSR promueve la activación de la vía de señalización de Gβγ-PI3K-AKT-mTOR.

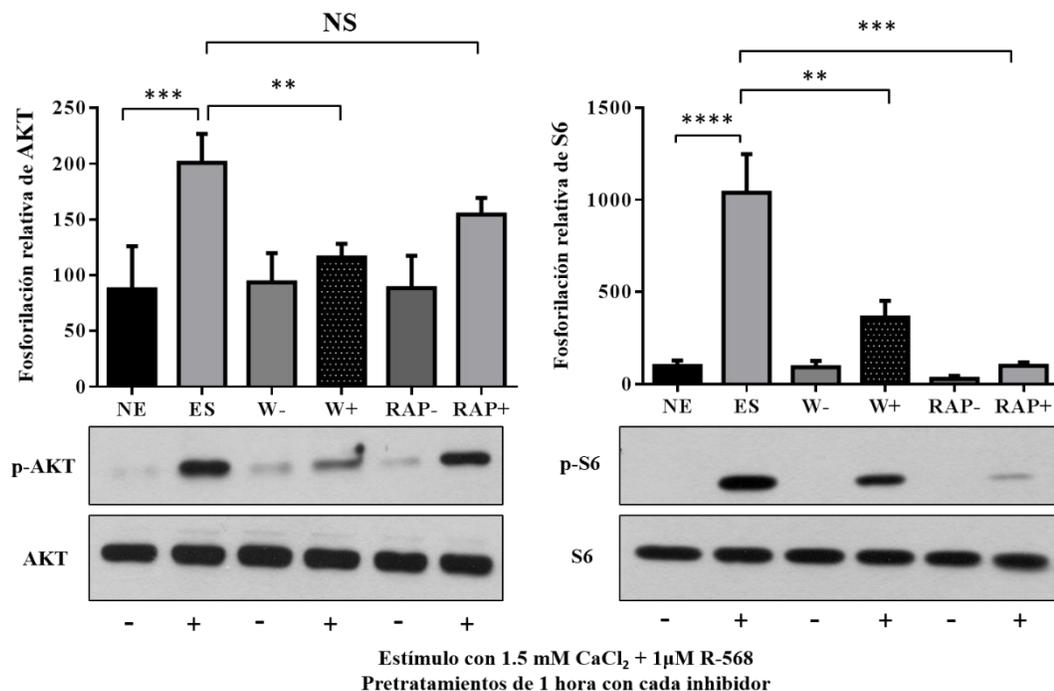


Figura 16. Efecto en la fosforilación de AKT y S6 con los inhibidores Wortmanina y Rapamicina. Las células con la mutante CaSR_{N639K} se pretrataron con los inhibidores indicados (Tabla 3) y se estimularon durante 10 minutos con Ca²⁺, R-568 en presencia o ausencia de los inhibidores. Los lisados celulares obtenidos fueron analizados por *Western blot*. NE, corresponde al no estimulado; ES, corresponde a la condición estimulada; W-, corresponde a la condición con la Wortmanina sin estímulo; W+, corresponde a la condición con Wortmanina pero con estímulo; RAP-, corresponde a la condición con la Rapamicina sin estímulo; RAP+, corresponde a la condición con la Rapamicina y estímulo. Las barras comprenden SEM; **p < 0.001, ***p < 0.005, ****p < 0.0001 n=3.

Análisis de la secreción de los factores quimiotácticos promovidos por el CaSR^{Silvestre} y la mutante CaSR_{N639K} y su efecto en la migración de células endoteliales de aorta de porcino (PAE).

Como se había mencionado anteriormente el CaSR tiene la capacidad de regular la secreción de diferentes factores quimiotácticos, tanto en condiciones fisiológicas como en condiciones patológicas. Para analizar los factores secretados por estimulación del CaSR se decidió primero realizar una curva dosis/tiempo en la clona CaSR_{639K} para determinar a qué concentración de calcio y que tiempo es el adecuado para promover la secreción de factores quimiotácticos, por lo que obtuvimos los medios condicionados de la clona estables del receptor mutante CaSR_{N639K}, las cuales se estimularon con concentraciones crecientes de calcio de 1 a 2 mM y a dos tiempos de estímulo de 3 y 6 horas (Tabla 3), estos medios condicionados se sometieron a ensayos de migración de células PAE en cámara de Boyden.

Como se muestra en la Figura 17, los medios condicionados recuperados de la mutante CaSR_{N639K} promovieron la migración de las células PAE con diferencia significativa a las 3 horas de estímulo y a una concentración de 1.5 mM de calcio, sugiriendo que esas son las condiciones ideales de estímulo para promover una mayor secreción de factores quimiotácticos. A las 6 horas se observó una tendencia en la migración de células PAE, sin embargo, no obtuvimos una diferencia significativa en la migración celular entre las diferentes condiciones ya mencionadas.

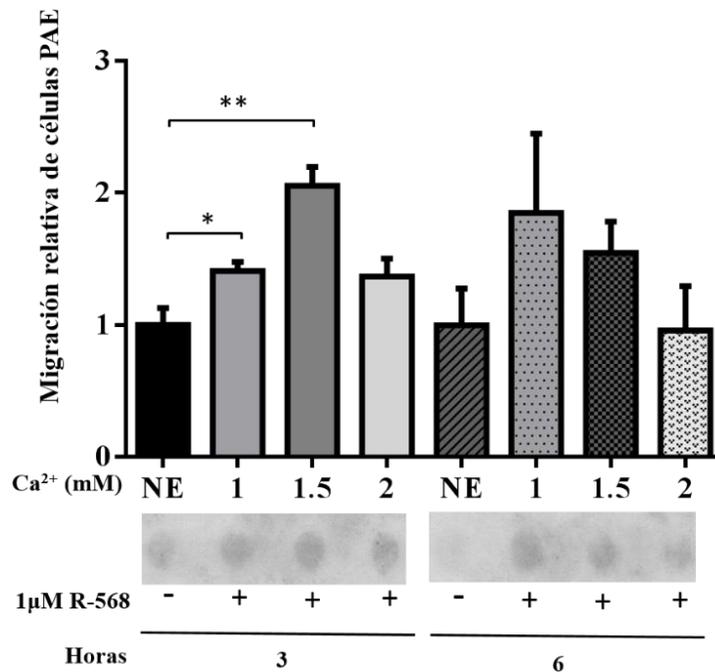


Figura 17. Curva dosis/tiempo de la secreción de factores quimiotácticos en la clona CaSR_{N639K}. Células de la clona CaSR_{N639K} fueron ayunadas durante 16 horas y estimuladas con diferentes concentraciones de calcio (1-2 mM) más el calcimimético R-568 durante 3 y 6 horas. Los medios condicionados fueron recuperados y se procesaron para inducir la migración de células PAE. El gráfico muestra un análisis densitométrico, de cuatro experimentos independientes. Las barras representan SEM, *p<0.05, **p<0.001.

Después de determinar a qué concentración de calcio y el tiempo adecuado para promover la secreción de factores quimiotácticos por la mutante CaSR_{N639K}, nos preguntamos qué efecto tendría la mutante en la secreción de estos factores si los comparamos con la secreción del receptor CaSR_{Silvestre}. Por lo que obtuvimos medios condicionados de las clonas estables del receptor CaSR_{Silvestre} y de la mutante CaSR_{N639K} estimuladas durante 3 horas a concentraciones crecientes de calcio de 1 a 2 mM más 1 μM del R-568. Estos medios los sometimos a ensayos de migración en cámara de Boyden utilizando células PAE

En la Figura 18 podemos observar que los medios condicionados obtenidos de la clona del receptor CaSR_{Silvestre} fueron capaces de inducir migración desde una concentración de calcio de 1 mM, pero la concentración de 1.5 mM nos dió una diferencia más significativa mientras que la concentración de 2 mM de calcio fue capaz de inducir una migración similar a la de 1 mM. Por otro lado, la inducción de la migración con los medios condicionados de la clona con la mutante CaSR_{N639K} fueron capaces de inducir un patrón de migración semejante al receptor silvestre, sin embargo, se observó una prominente disminución en la migración de las células PAE, esto indica que hay una menor secreción de factores quimiotácticos en comparación con la clona del receptor silvestre (Fig. 18).

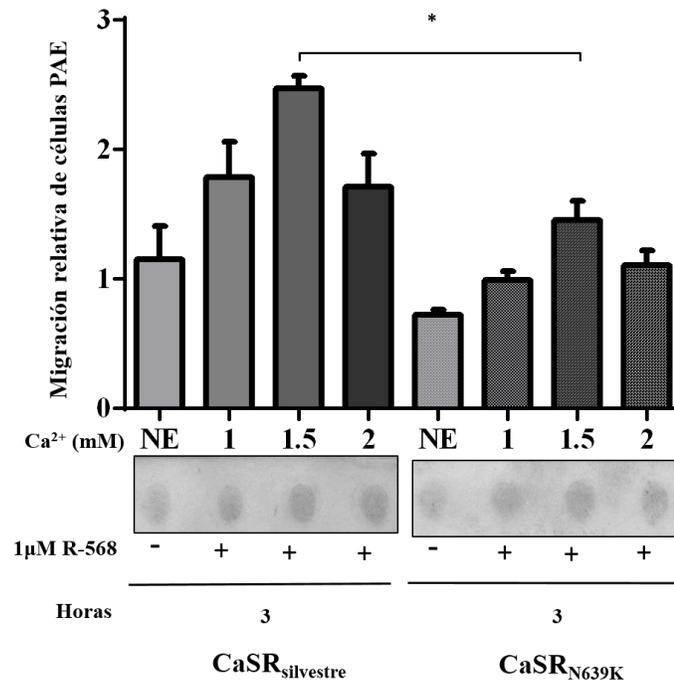


Figura 18. Análisis de la secreción de factores quimiotácticos secretados en respuestas a la estimulación de la mutante CaSR_{N639K} y el CaSR_{Silvestre}. Células de las clonas CaSR_{Silvestre} y CaSR_{N639K} se ayunaron durante 16 horas y fueron estimuladas como se indica en la Figura. Los medios condicionados se recuperaron y se procesaron para el ensayo de migración en cámara de Boyden utilizando células PAE. NE, corresponde a la condición no estimulada. El gráfico muestra un análisis densitométrico de cuatro experimentos independientes. *p<0.05.

Identificación de los factores quimiotácticos secretados por las clonas estables CaSR_{Silvestre} (Clona 7) y la clona CaSR_{N639K}.

En nuestro laboratorio recientemente se demostró que el CaSR tiene la capacidad de inducir la secreción de factores angiogénicos y quimiotácticos como GM-CSF, EGF, MDC/CCL22, FGF-4 e IGFBP2 en líneas celulares de cáncer metastásico (MDA-MB-231) (Hernandez-Bedolla et al. 2015).

Por lo que nos preguntamos cual es la identidad de los factores que son secretados cuando se estimula el CaSR en nuestro sistema utilizando células HEK-293.

Para esto, se obtuvieron los medios condicionados de las clonas estables con el receptor CaSR_{Silvestre} y la mutante CaSR_{N639K} utilizando las condiciones de estímulo de 1.5 mM de calcio más 1 μ M de R-568 durante 3 horas, se recuperaron los medios condicionados y se determinaron los factores quimiotácticos mediante citometría de flujo utilizando el *kit* llamado *Cytometric Bead Array* (CBA) de BD Biosciences, el cual tiene la cualidad de que podemos detectar y cuantificar citocinas inflamatorias y quimiocinas dependiendo del *kit* que utilicemos.

Con este acercamiento se detectaron a la IL-8 de las 6 citocinas del *kit* y a MCP-1 de las 5 quimiocinas del *kit*. Por lo que decidimos graficar los resultados obtenidos para IL-8 y MCP-1. Como podemos observar en la Fig. 19 la clona con el receptor silvestre (CaSR_{Silvestre}) promovió la secreción de interleucina 8 (IL-8) (Fig. 19, A) y la quimiocina MCP-1 (Fig. 19, B) cuando se estimuló el receptor y se disminuyó hasta llegar al basal cuando se administró el calcilítico NPS-2143. Por otro lado, cuando evaluamos la clona con el receptor mutante (CaSR_{N639K}) se observó que de igual manera esta clona fue capaz de inducir la secreción de interleucina 8 (IL-8) y MCP-1 (Fig. 19, A y B) y esta secreción también disminuyó cuando se administró el NPS-2143 junto con el estímulo. Sin embargo, como se puede apreciar en la Figura, la secreción se encuentra significativamente disminuida para IL-8 (alrededor de 10 veces menos) y para MCP-1 (alrededor de 2 veces menos) en la mutante CaSR_{N639K} si la comparamos con el CaSR_{Silvestre} (Fig. 19, A y B).

Estos resultados nos indican que los receptores CaSR_{Silvestre} y CaSR_{N639K} son capaces de regular la secreción de IL-8 y MCP-1 y que la disminución en la secreción promovida por la mutante CaSR_{N639K} se correlaciona con la disminución observada por parte de la mutante en la activación de la vía G β γ -PI3K-AKT-mTOR.

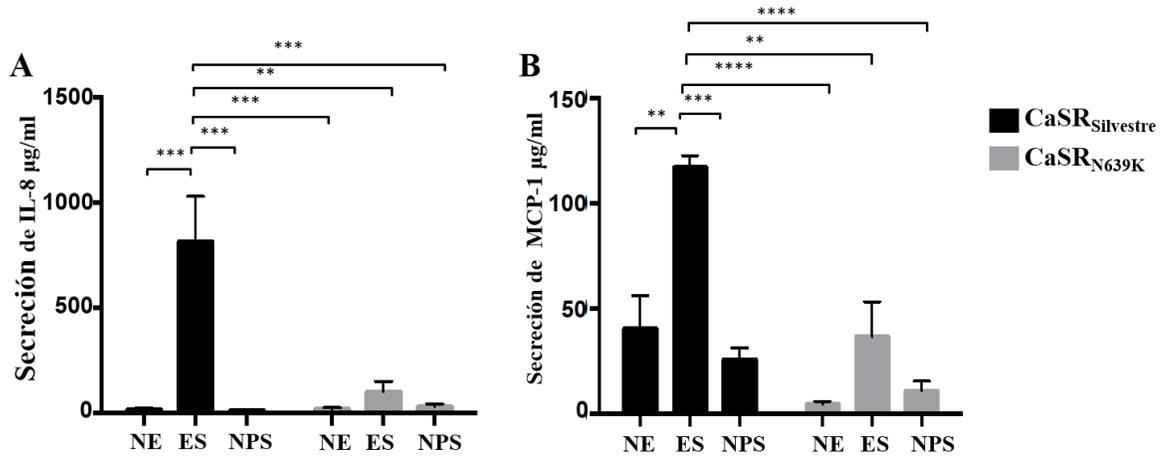


Figura 19. Determinación de la identidad de los factores quimiotácticos secretados en respuesta a la estimulación del CaSR. Los medios condicionados de las clonas estables (CaSR_{Silvestre} y CaSR_{N639K}) se obtuvieron y se sometieron a ensayos de citometría de flujo con el *kit* llamado *Cytometric Bead Array* (CBA) de BD Biosciences para la detección y cuantificación de citocinas inflamatorias y quimiocinas. El gráfico muestra un análisis de intensidad de fluorescencia, de tres experimentos independientes. Las barras representan SEM, ** $p < 0.001$, *** $p > 0.005$, **** $p < 0.005$.

DISCUSIÓN

El receptor sensor de calcio (CaSR), miembro de la familia 3 (C) de receptores acoplados a proteína G, desempeña un papel clave en la regulación de la homeostasis de calcio extracelular. Los trastornos en la homeostasis de Ca^{2+} fisiológico resultan de anomalías en estructura, nivel de expresión y/o función del CaSR o de sus componentes de señalización río abajo. El CaSR es un receptor acoplado a proteínas G con más de 200 mutaciones que producen alteraciones en su función, 135 del tipo inactivante asociadas a FHH/NSHPT y 68 de ganancia de función relacionadas a ADH, la mayoría de las cuales son mutaciones puntuales con pérdida o ganancia de la función y se localizan a lo largo de la estructura del receptor. Desde el punto de vista oncológico el CaSR se coloca como el segundo GPCR mutado con mayor frecuencia en cáncer. Además, se encuentra sobreexpresado en pacientes con cáncer de mama en estadios avanzados que presentan metástasis a hueso.

La mutante CaSR_{N639K} analizada en este trabajo fue identificada en cáncer de mama y se localiza en la primera asa intracelular del receptor. La selección de esta mutante se realizó considerando que en el laboratorio se caracterizó su señalización promovida por las proteínas $G\alpha$, con esta aproximación, resultó que esta mutante posee el acople con las proteínas $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ y $G\alpha_s$, perdiendo su capacidad de discernir entre estas, esto se determinó analizando la activación de la cinasa de ERK 1/2. A pesar de que esta mutante tuvo diferencias en el acople a las proteínas G, no se observó una disminución en la activación de la cinasa de ERK 1/2 comparada con el silvestre. Otra de las razones por las cuales se seleccionó esta mutante fue porque la participación de alteraciones o mutaciones en la primera asa intracelular en la señalización en los GPCRs ha sido poco estudiada, de hecho, se han identificado 4 mutaciones en esta asa de las cuales solo una se ha caracterizado como una mutación inactivante (White et al. 2009; Hu et al. 2007). Por otro lado, en el laboratorio se ha demostrado que el CaSR es capaz de activar la vía de señalización $G\beta\gamma$ -PI3K-AKT-mTOR (datos no publicados), debido a esto nosotros hipotetizamos que la mutación podría alterar los sitios consenso del reconocimiento del heterodímero $G\beta\gamma$ por parte del receptor y modificar la señalización de la vía PI3K-AKT-mTOR, así como los sitios de reconocimiento de las proteínas $G\alpha$.

El primer parámetro que se analizó, fue la expresión del receptor mutante por análisis de *Western blot* donde se detectan dos bandas, una forma intracelular de alto contenido de manosa incompletamente inmadura de aproximadamente de 130 kDa y una forma madura que se encuentra en la superficie celular totalmente glucosilada de aproximadamente 150 kDa, cabe destacar que la glicosilación no parece ser crucial para la función de CaSR, sino más bien para el plegamiento y el tráfico adecuado

del mismo (Ray and Clapp, 1998). Debido a que la mutante no altera alguna región crucial para la glicosilación, ya que esta se expresó de manera adecuada mostrando doble bandeo de 130 y 150 kDa en condiciones no reductoras y mostró una expresión semejante al receptor silvestre, sugiriendo que la mutante CaSR_{N639K} se procesa de forma normal.

El análisis de la activación en la vía G $\beta\gamma$ -PI3K-AKT-mTOR en un curso temporal, encontramos que la mutante CaSR_{N639K} activa de manera diferencial los efectores de esta vía, ya que no muestra la misma capacidad comparada con el receptor silvestre para fosforilar a AKT Y S6. Adicionalmente, determinamos que la fosforilación de AKT y S6 se disminuye considerablemente en presencia del calcilítico NPS-2143; esto indica 2 cosas, que la mutación en esta asa no afecta el sitio de interacción de moduladores alostéricos y que la fosforilación de los efectores depende del estímulo del CaSR.

Nuestros resultados del análisis de secreción mostraron una diferencia en el patrón de secreción entre la mutante y el receptor silvestre. La mutante CaSR_{N639K} promueve la secreción disminuida de factores quimiotácticos, lo que probablemente tenga una relación con la disminución en la señalización de la vía de G $\beta\gamma$ -PI3K-AKT-mTOR y del cambio de afinidad en las proteínas G α que promueve la mutante. Considerando que en el laboratorio ya se tenía el antecedente que el CaSR es capaz de regular la secreción de diferentes factores quimiotácticos en células MDA-MB-231 y que esta secreción es promovida por la vía de G $\beta\gamma$ -PI3K-AKT-mTOR y de mecanismos de transactivación de EGFR por el CaSR (Hernandez-Bedolla et al. 2015). Por lo que, determinamos la identidad de los factores quimiotácticos en nuestro sistema de células HEK-293 donde expresamos establemente a la mutante CaSR_{N639K}, mediante el uso de un pool de perlas capaz de detectar alrededor de diez interleucinas y quimiocinas por citometría de flujo pudimos detectar que solo interleucina 8 y MCP-1 fueron secretadas tanto por el receptor silvestre como por la mutante CaSR_{N639K}.

Con los datos obtenidos en este trabajo, hasta el momento nos sugiere que la mutación CaSR_{N639K} promueve en el CaSR un comportamiento de pérdida de la función señalizante del CaSR. Cabe mencionar que un estudio realizado en el 2009 por White *et al.* caracterizaron una serie de mutaciones de las cuales la mutación R638L se encuentra en la primera asa intracelular, el cambio de una arginina por una leucina produjo un comportamiento inactivante en este receptor (Hu et al. 2007; White et al. 2009).

Otra de las posibilidades por las que obtuvimos este efecto en la mutante pudiera ser debido a que el cambio de aminoácido en la asa intracelular genere un cambio en la estructura o el ambiente químico que altere la interacción del receptor con las proteínas G heterotriméricas, por ejemplo en el receptor

para tirotrópina (TSHR), en 2010, Kleinau *et al.* reportaron la importancia de la primera asa intracelular para la activación de la proteína G heterotriméricas y sus posibles interacciones con las proteínas G α como con G $\beta\gamma$, en este trabajo se encontró que aminoácidos en la asa intracelular son importante para dar la selectividad en el acople y la activación de las proteínas G α_q pero no para G α_s (Kleinau *et al.* 2010). Esta posibilidad confirma que nuestra mutante con una mutación en la primera asa intracelular posee un cambio en el acople que ya no es selectivo entre las diferentes proteínas G, esto analizado por la vía de ERK 1/2 en presencia de inhibidores de las vías de G α_q , G α_s y G α_i (Orduña Castillo, 2016).

Por otro lado, se sabe que los GPCR acoplados a G α_i activan las vías de señalización de PI3K-AKT-mTOR a través del heterodímero G $\beta\gamma$ (Vázquez-Prado *et al.* 2016), hasta el momento no se había analizado el efecto de mutantes sobre la vía de PI3K-AKT-mTOR por lo que, decidimos en este trabajo estudiar esta vía de señalización y encontramos que el cambio de aminoácido de uno polar sin carga (N, Asparagina) por un polar con carga como la lisina (K) en la asa intracelular disminuye la señalización por G $\beta\gamma$. Interesantemente, en el trabajo de Kleinau demostraron además que aminoácidos en esta asa intracelular de receptores que se acoplan a G α_q coordinan la interacción con G β , así pues, si el CaSR silvestre se acopla a G α_q , en la mutación CaSR_{N639K} con el cambio de aminoácido polar sin carga por uno con carga y anfipático podría modificar la interacción de G α_q como de G $\beta\gamma$. Además, Kleinau encontró que el aminoácido R450 localizado entre la primera asa intracelular y el segundo pase transmembranal interacciona con el aminoácido E349 en la proteína G α_q y al hacer un análisis comparativo de aminoácidos entre las diferentes proteínas G α , se encontró que el aminoácido E349 en G α_q corresponde al aminoácido Q390 en G α_s y D350 en G α_i , por lo que el cambio de aminoácido en la mutante CaSR_{N639K} del CaSR pudiera ya no coordinar adecuadamente con los aminoácidos E349 y D350 en G α_q y G α_i respectivamente, y por lo tanto ya no pueda discernir entre las proteínas G α_q , G α_i y G α_s .

CONCLUSIONES

- La mutante CaSR_{N639K} encontrada en cáncer de mama se expresa de manera similar al receptor CaSR_{Silvestre} (clona 7).
- La mutante CaSR_{N639K} posee la capacidad de promover la activación de efectores de la vía G_{βγ}-PI3K-AKT-mTOR de señalización cuando es estimulada con calcio y R-568.
- La mutante CaSR_{N639K} genera patrones distintos de activación de AKT y S6 a los obtenidos con el CaSR_{Silvestre}. La mutante posee una activación de los efectores de la vía disminuida comparada con la silvestre
- La mutante CaSR_{N639K} promueve la secreción de factores quimiotácticos en células HEK-293
- La secreción de factores quimiotácticos promovida por la mutante CaSR_{N639K} se encuentra disminuida comparada con el CaSR_{Silvestre}
- La interleucina-8 (IL-8) y proteína quimioatrayente de monocitos-1 (CCL2/MCP-1) son los factores quimiotácticos secretados tanto por el CaSR_{Silvestre} como por la mutante CaSR_{N639K}.
- El cambio de aminoácido de una asparagina (N) por una lisina localizado en la primera asa intracelular al parecer altera la interacción con las proteínas G heterotriméricas, produciendo un fenotipo inactivante en la señalización de la vía G_{βγ}-PI3K-AKT-mTOR y repercutiendo en el efecto funcional de la secreción regulada por el CaSR.

PRESPECTIVAS

- Realizar un análisis bioinformático para realizar modelos del receptor silvestre y del receptor mutante N639K acoplados a las diferentes proteínas G y determinar posibles aminoácidos localizados en la primera asa intracelular que pudieran promover las interacciones con las proteínas G, así como ver el efecto estructural que produce la mutación N639K en el CaSR y en el acople de las diferentes proteínas G.
- Caracterizar otras mutaciones localizadas en la primera asa intracelular asociadas a diferentes patologías para determinar la importancia de esta asa con el acople y la señalización de las proteínas G heterotriméricas.

REFERENCIAS

- Alfadda, T. I., Saleh, M. A., Houillier, P., and Geibel, J. P. (2014). Calcium-sensing receptor 20 years later. *Am J Physiol Cell Physiol* 307, 221–231.
- Bar-Shavit, R., Maoz M., Kancharla A., Nag, J. K., Agranovich, D., Grisaru-Granovsky, S., and Uziely, B. (2016). G Protein-Coupled Receptors in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 1320(17), 1-16.
- Bockaert, J., and Pin, J. P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *The EMBO Journal* Vol.18 No.7 pp.1723–1729.
- Brennan, S. C., Thiem, U., Roth, S., Aggarwal, A., Fetahu, I. Sh., Tennakoon, S., Gomes, A. R., Brandi, M. L., Bruggeman, F., Mentaverri, R., Riccardi, D., Kallay, E. (2013). Calcium sensing receptor signalling in physiology and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1833; 1732–1744.
- Brown, E. M. (2013). Role of the calcium-sensing receptor in extracellular calcium homeostasis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 27, 333–343.
- Brown, E. M., and MacLeod, R. J. (2001). Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol. Rev.* 81,239–297.
- Charlton S. (2009). Agonist efficacy and receptor desensitization: from partial truths to a fuller picture. *British Journal of Pharmacology.* 158, 165–168.
- Chen, R. A., and Goodman, W. G. (2004). Role of the calcium-sensing receptor in parathyroid gland physiology. *Am J Physiol Renal Physiol.* 286, 1005-1011.
- Cheng, I., Klingensmith, M. E., Chattopadhyay, N., Kifor, O., Butters, R. R., Soybel, D.I. (1998). Identification and localization of the extracellular calcium-sensing receptor in human breast. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83,703–707.
- Conigrave, A. D., and Ward, D. T. (2013). Calcium-sensing receptor (CaSR): Pharmacological properties and signaling pathways. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 27, 315-331.
- Díaz-Soto, G., Rocher, A., García-Rodríguez, C., Núñez, L., and Villalobos, C. (2016). The Calcium-Sensing Receptor in Health and Disease. *International Review of Cell and Molecular Biology.* 327, 321-369.
- Dorsam, R. T., and Gutkind, J. S. (2007). G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 7, 79-94.
- Ferre, S., Hoenderop, J. G. J., and Bindels, R. J. M. (2012). Sensing mechanisms involved in Ca²⁺ and Mg²⁺ Homeostasis. *Kidney International.* 82, 1157–1166.

Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L. G., and Schiöth, H. B. (2003). The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Mol Pharmacol* 63, 1256–1272.

Hannan, F. M., Babinsky, V. N., and Thakker, R. V. (2016). Disorders of the calcium-sensing receptor and partner proteins: insights into the molecular basis of calcium homeostasis. *Journal of Molecular Endocrinology*. 57, R127–R142.

Hendy, G. N., Guarnieri, V., and Canaff, L. (2009). Calcium-Sensing Receptor and Associated Diseases. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 89, 31-95.

Hernandez-Bedolla, M. A., Carretero-Ortega, J., Valdez-Sanchez, M., Vazquez-Prado, J., Reyes-Cruz, G. (2013). Chemotactic and proangiogenic role of Calcium-Sensing Receptor is linked to secretion of multiple cytokines and growth factors in breast cáncer MDA-MB-231 cellas. *Biochimica et Biophysica Acta* 1853 (2015) 166–182.

Hidalgo Moyle, J. J. (2014). Análisis Funcional de Mutaciones en el Receptor Sensor de Calcio Encontradas en Cáncer de Mama. Departamento de Biología Celular. Cincvestav-IPN.

Hofer, A. M., and Brown, E. M. (2003). Extracellular Calcium Sensing and Signalling. *Nat. Rev.* 4, 530-538.

Hu, J., and Spiegel, A. M. (2007). Structure and function of the human calcium-sensing receptor: insights from natural and engineered mutations and allosteric modulators. *J. Cell. Mol. Med.* 11(5), 908-922.

Huang, C., Hydo, L. M., Liu, S., and Miller, R. T. (2009). Activation of choline kinase by extracellular Ca²⁺ is Ca(2+)-sensing receptor, Galpha12 and Rho-dependent in breast cancer cells. *Cell. Signal.* 21, 1894–1900.

Huang, Y., Cavanaugh, A., and Breitwieser, G. E. (2011). Regulation of Stability and Trafficking of Calcium-Sensing Receptors by Pharmacologic Chaperones. *Advances in Pharmacology*. 62, 143-173.

Joeckel, E., Haber, T., Prawitt, D., Junker, K., Hampel, C., Thüroff, J.W., Roos, F.C., Brenner, W., 2014. High calcium concentration in bones promotes bone metastasis in renal cell carcinomas expressing calcium-sensing receptor. *Mol. Cancer* 13, 42.

Katritch, V., Cherezov, V., and Stevens, R. C. (2013). Structure-Function of the G Protein–Coupled Receptor Superfamily. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53:531–56.

Kim W., and Wysolmerski, J. J. (2016). Calcium-Sensing Receptor in Breast Physiology and Cancer. *Frontiers in Physiology*. 7 (440), 1-11.

- Kleinau, G., Jaeschke, H., Worth, C., L., Mueller, S., Gonzalez, J., Paschke, R., Krause, G. (2010). Principles and Determinants of G Protein Coupling by the Rhodopsin-Like Thyrotropin Receptor. *Plos One*. 5(3).
- Kobilka B. K. (2006). G protein coupled receptor structure and activation. *Biochimica and Biophysica Acta*. 1768, 794–807.
- Kobilka, B. K., Masureel, M., and Hilger, D. (2018). Structure and dynamics of GPCR signaling Complexes. *Nat. Struc. and Mol. Biol.* 25, 4–12.
- Lappano, R., And Maggiolini, M. (2011). G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer. *Nat. Rev. Drug Discovery*. 10, 47-60
- Lappano, R., And Maggiolini, M. (2012). GPCR and Cáncer. *Acta Pharmacologica Sinica*. 33: 351-362.
- Latorraca, N. R., Venkatakrishnan, A. J., and Dror, R. O. (2016). GPCR Dynamics: Structures in Motion. *Chem. Rev.* n/a, n/a-n/a.
- Leach, K., Sexton, P. M., Christopoulos, A., and Conigrave, A. D. (2014). Engendering biased signalling from the calcium-sensing receptor for the pharmacotherapy of diverse disorders. *Br. J. Pharmacol.* 171, 1142–1155.
- Liao, J., Schneider, A., Datta, N.S., McCauley, L.K., 2006. Extracellular calcium as a candidate mediator of prostate cancer skeletal metastasis. *Cancer Res*. 66, 9065–9073.
- Liu, Y., An, S., Ward, R., Yang, Y., Xiao-Xi Guo, Li, W., Tian-Rui Xu. (2016). G protein-coupled receptors as promising cancer targets. *Cancer Letters* 376, 226-239.
- Magno, A. L., Ward, B. K., and Ratajczak, T. (2011). The Calcium-Sensing Receptor: A Molecular Perspective. *Endocrine Reviews*. 32(1), 3–30
- Mannstadt, M., Bilezikian², J. P., Thakker, R. V., Hannan, F. M., Clarke, B. L., Rejnmark⁶, L., Mitchell, D. M., Vokes, T. J., Winer, K. K., and Shoback D. M. (2017). Hypoparathyroidism. *Nat. Rev. Disease Primers*. 3 (17055), 1-20.
- Mayr, B., Schnabel, D., Helmuth-Günther Dörr and Schöfl, C. (2016). Gain and loss of function mutations of the calcium-sensing receptor and associated proteins: current treatment concepts. *European Journal of Endocrinology*. 174, R189–R208.
- Mihai, R., Stevens, J., Mckinney, C., Andlbrahim, N. B. (2006). Expression of the calcium receptor in human breast cancer—a potential new marker predicting the risk of bone metastases. *Eur. J. Surg. Oncol.* 32, 511–515.

O'Hayre, M., Vázquez-Prado J., Kufareva, I., Stawiski, E. W., Handel, T. M., Seshagiri, S., and Gutkind, J. S. (2013). The emerging mutational landscape of G proteins and G-protein-coupled receptors in cancer. *Nat. Rev. Cancer* Advance Online Publication.

Orduña Castillo L. B. (2016). Analisis de la activación de las RhoGTPasas, Rac y Cdc42, por Mutantes del CaSR Encontradas en Pacientes con Cáncer de Mama. . Departamento de Biología Celular. Cincvestav-IPN.

Pierce, K. L., Premont, R. T., and Lefkowitz, R. J. (2002). Seven-Transmembrane Receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 639-650.

Ray K. (2015). Calcium-Sensing Receptor: Trafficking, Endocytosis, Recycling, and Importance of Interacting Proteins. *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* 132, 877-1173

Ray, K., Adipietro, K. A., and Chen, C. (2007). Elucidation of the Role of Peptide Linker in Calcium-Sensing Receptor Activation Process. *Journal of Biological Chemistry.* 282, 5310–5317.

Ray, K., Clapp, P., Goldsmith, P. K., and Spiegel A., M. (1998). Identification of the Sites of N-Linked Glycosylation on the Human Calcium Receptor and Assessment of Their Role in Cell Surface Expression and Signal Transduction. *The Journal of Biological Chemistry* 273(51), 34558–34567.

Ritter, S. L., and Hall, R. A. (2009). Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 819-830.

Saidak, Z., Boudot, C., Abdoune, R., Petit, L., Brazier, M., Mentaverri, R., et al. (2009). Extracellular calcium promotes the migration of breast cancer cells through the activation of the calcium sensing receptor. *Exp. Cell Res.* 315, 2072–2080.

Smith, K. A., Ayon, R. J., Tang, H., Makino, A., and Yuan, X. J. (2016). Calcium-Sensing Receptor Regulates Cytosolic $[Ca^{2+}]$ and Plays a Major Role in the Development of Pulmonary Hypertension. *Frontiers in Physiology.* 7(517), 1-7.

Syrovatkina, V., Alegre, K. O., Dey, R., and Huang Xin-Yun. (2016). Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *J Mol. Biol.* 428, 3850–3868.

Tennakoon, S., Aggarwal, A., Kállay, E. (2016). The calcium-sensing receptor and the hallmarks of cáncer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1863, 1398–1407.

Tharmalingam, S., and Hampson, D. R. (2016). The Calcium-Sensing Receptor and Integrins in Cellular Differentiation and Migration. *Frontiers in Physiology* 7 (190), 1-18.

Thomsen, A.R., Hvidtfeldt, M., and Brauner-Osborne, H. (2012). Biased agonism of the calcium-sensing receptor. *Cell Calcium* 51, 107–116.

- VanHouten J. N., and Wysolmerski, J. J. (2013). The calcium-sensing receptor in the breast. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 27 (2013) 403–414.
- VanHouten, J. N., and Wysolmerski, J. J. (2007). Transcellular calcium transport in mammary epithelial cells. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 12, 223–235.
- VanHouten, J., Dann, P., McGeoch, G., Brown, E. M., Krapcho, K., Neville, M., et al. (2004). The calcium-sensing receptor regulates mammary gland parathyroid hormone-related protein production and calcium transport. *J. Clin. Invest.* 113, 598–608.
- Vázquez-Prado, J., Bracho-Valdés, I., Cervantes-Villagrana, R., D., and Reyes-Cruz G. (2016). Gβγ Pathways in Cell Polarity and Migration Linked to Oncogenic GPCR Signaling: Potential Relevance in Tumor Microenvironment. *Mol Pharmacol* 90:573–586.
- Ward, D. T., McLarnon, S. J., and Riccardi, D. (2002). Aminoglycosides increase intracellular calcium levels and ERK activity in proximal tubular OK cells expressing the extracellular calcium-sensing receptor. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 1481–1489.
- White, E., McKenna, J., Cavanaugh, A., and Breitwieser, G., E. (2009). Pharmacochaperone-Mediated Rescue of Calcium-Sensing Receptor Loss-of-Function Mutants. *Mol Endocrinol*, 23(7), 1115–1123.
- Zhang, C., Miller, C. L., Gorkhali, R., Zou, J., Huang, K., Brown, E. M., and Yang, J. J. (2016) Molecular Basis of the Extracellular Ligands Mediated Signaling by the Calcium-Sensing Receptor. *Frontiers in Physiology*. 7(441), 1-17.
- Zhang, D., Zhao, Q., and Wu, B. (2015). Structural Studies of G Protein-Coupled Receptors. *Mol. Cells*. 38(10), 836-842.